



Biochimie structurale : Protéines

Pr. Nadia DAKKA

Année Universitaire 2014-2015

Biochimie structurale

La biochimie structurale étudie, par des méthodes dérivées de la physique et de la chimie:

- -la composition chimique précise des molécules biologiques.
- -la façon dont ces atomes sont assemblés .
- -la structure tridimensionnelle qui en résulte.

La connaissance de la structure d'une molécule , de sa forme dans l'espace et permet de comprendre sa fonction.

La biochimie structurale étudie les biomolécules impliquées dans la majorité des processus vitaux :
Protéines, Acides nucléiques, Glucides et Lipides

Les Protéines



Les Objectifs:

Connaître la structure d'un AA

Reconnaître des molécules simples (AA) dans une structure complexe (protéine)

Mettre en évidence une propriété physique ou chimique

Savoir les différentes structures protéiques

Décrire les domaines d'une protéine qui participent à la fonction (relation structure fonction)

Fonctions des protéines

Les **protéines** remplissent des fonction très diverse dans l'organisme :

⟹ Elles **transportent** d'autres molécules comme l'hémoglobine qui transporte l'oxygène des poumons aux organes .

⟹ Elles jouent le rôle d'**hormone** et transmettent des messages à travers l'organisme, comme l'insuline .

⟹ Elles donnent une **forme** aux cellules comme le cytosquelette .

⟹ Elles permettent aux cellules de se **mouvoir** comme les flagelles ou les spermatozoïdes.

⟹ Certaines protéines sont des **catalyseurs** de réactions chimiques , ce sont les enzymes.

⟹ Certaines protéines assurent l'**identité** d'un organisme et **sa défense** : Les immunoglobulines qui permettent de reconnaître le soi du non-soi ; elles sont appelées anticorps.

⟹ Elles permettent la **régulation** de la machinerie métabolique : ce sont les activateurs ou les répresseurs.

⟹ Les protéines peuvent être **nuisibles** : comme les toxines.

Pourquoi les protéines ont-elles une gamme de propriétés aussi étendue?

Les Protéines

- Les protéines: les molécules les plus complexes et les plus variées des êtres vivants. On fabriquerait ~100 000 protéines différentes qui constituent plus de 50% du poids sec des cellules.

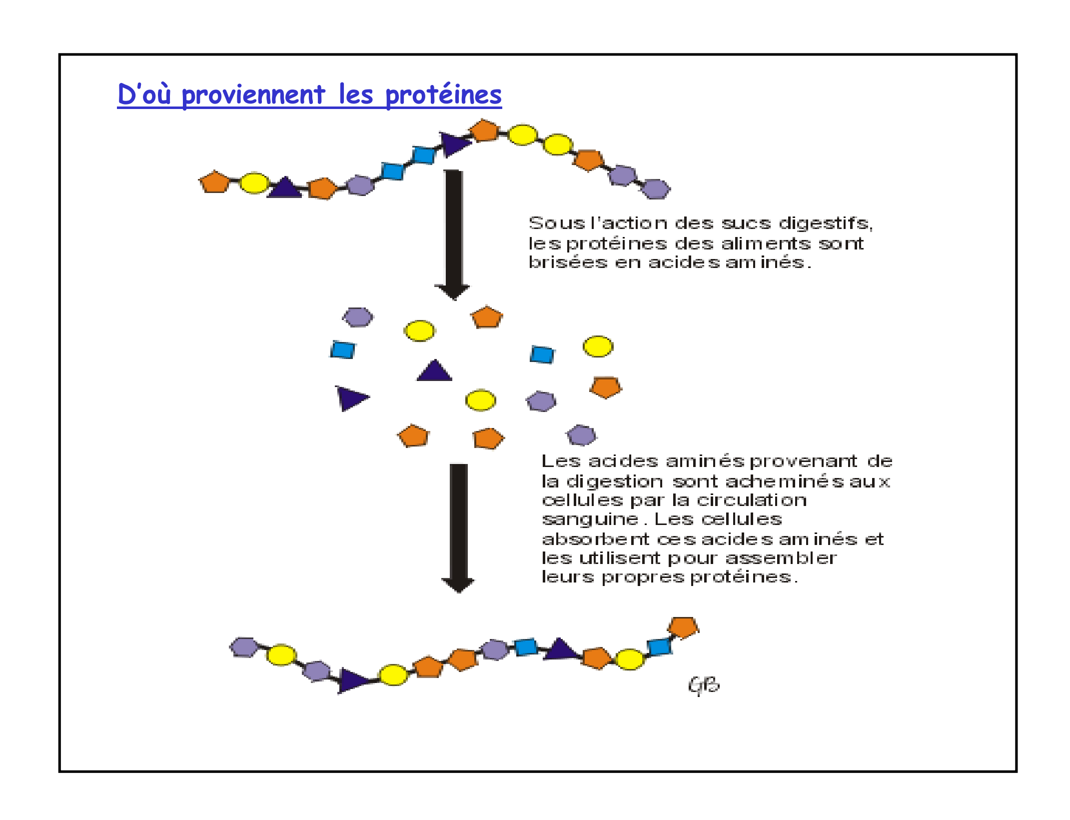
- Une protéine, est une **macromolécule** composée par une chaine d'**acides aminés** liés entre eux par des **liaisons peptidiques**. On parle de protéine lorsque la chaîne contient plus de 100 acides aminés.

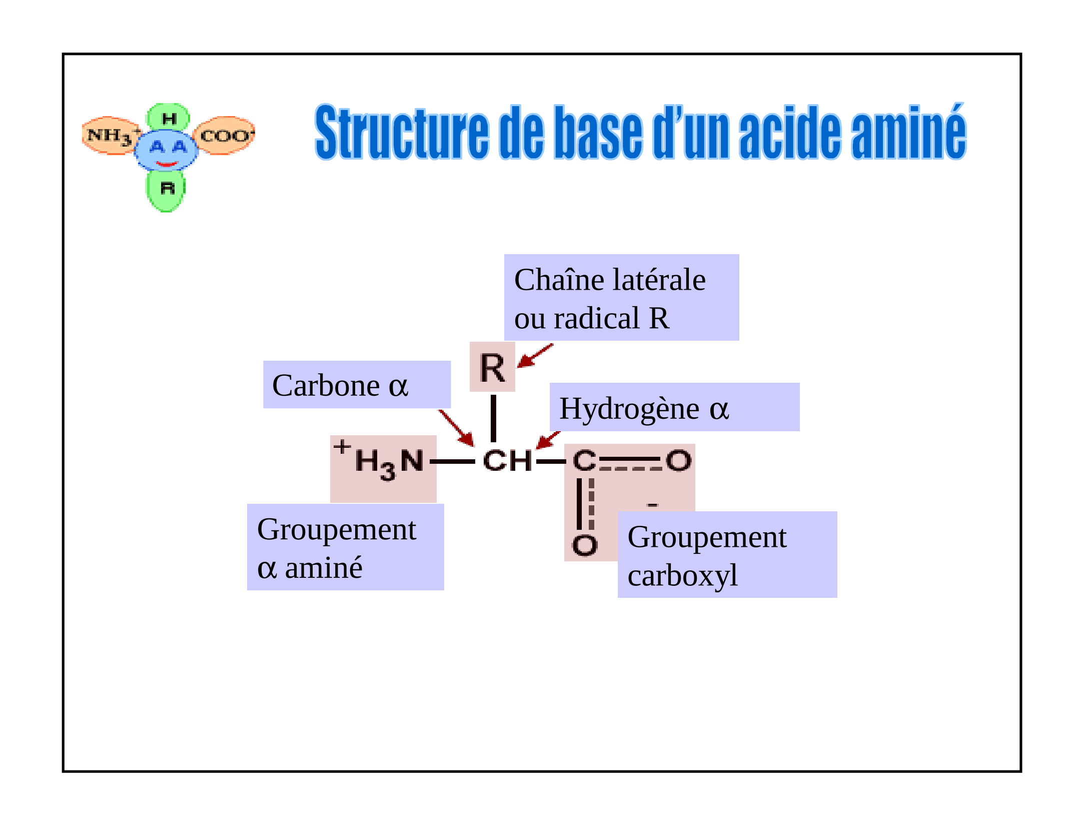
- Toutes les protéines résultent de la combinaison de **20** acides aminés différents. L'enchaînement de ces AA est codé par le ***génome*** .

- Un acide aminé est une substance organique avec une fonction amine et une fonction carboxylique.

- Un peptide est formé d'un nombre restreint d'AA (<100)

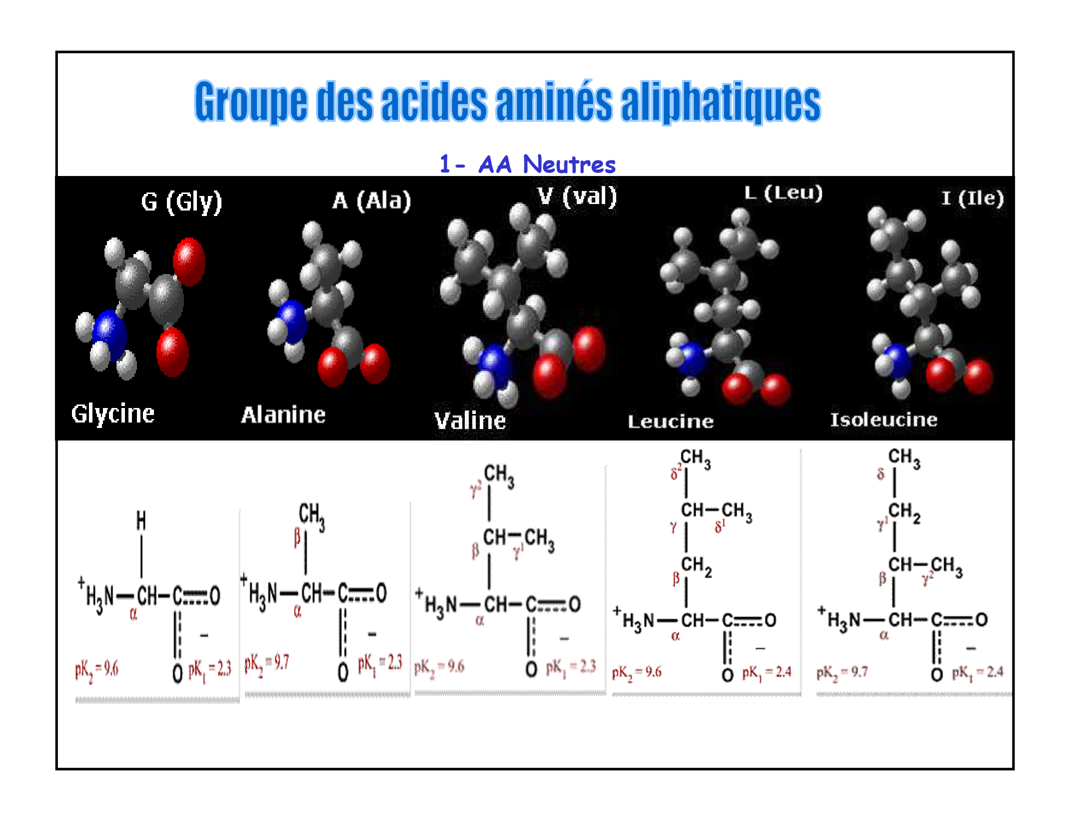
- Une protéine est formée d'un ou de plusieurs peptides.

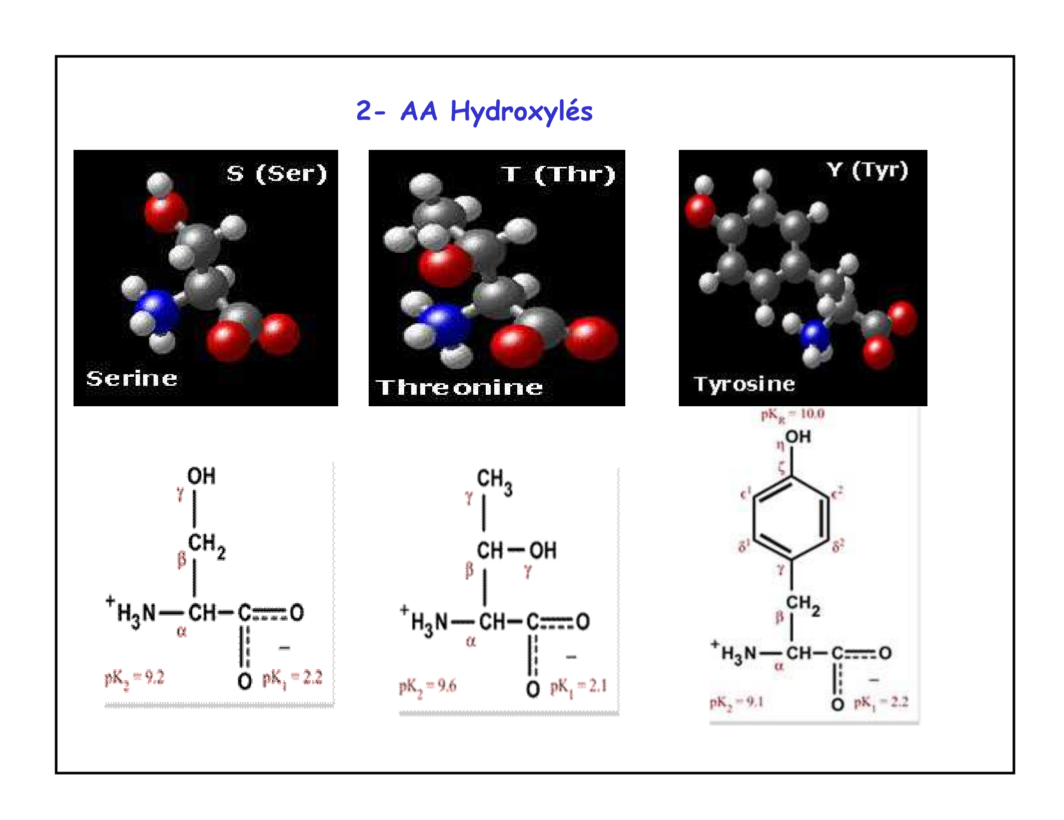

D'où proviennent les protéines
Sous l'action des sucs digestifs, les protéines des aliments sont brisées en acides aminés.
Les acides aminés provenant de la digestion sont acheminés aux cellules par la circulation sanguine. Les cellules absorbent ces acides aminés et les utilisent pour assembler leurs propres protéines.
GB

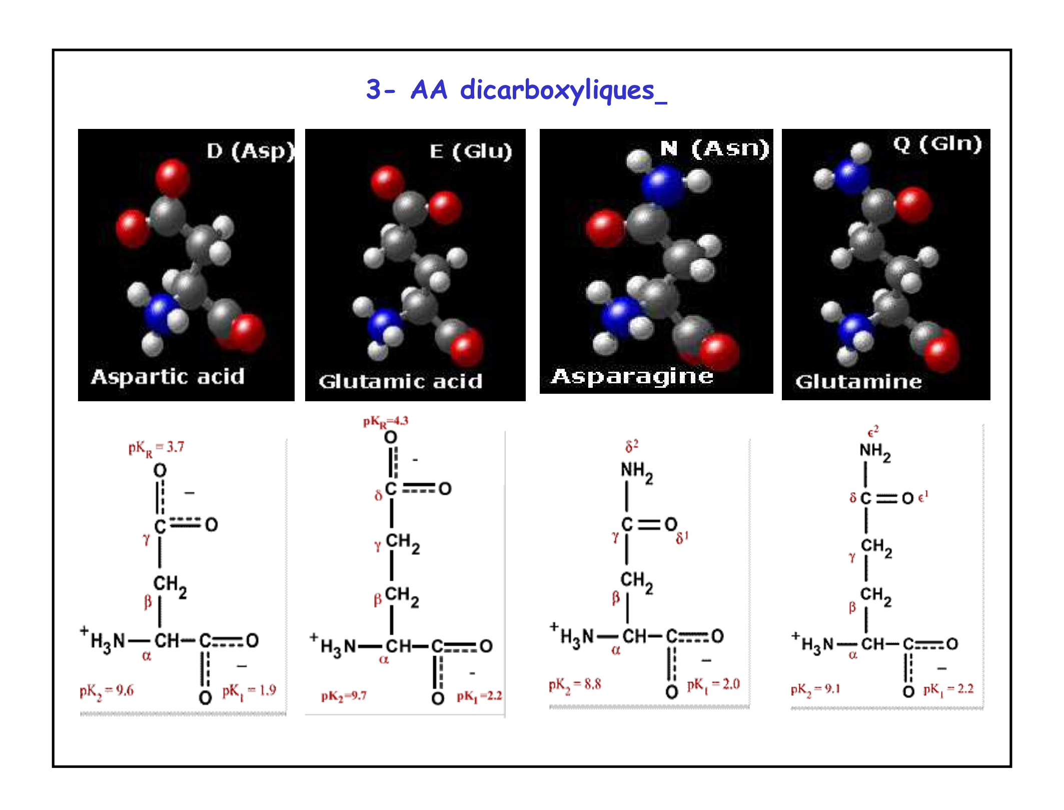

NH3+
H
A A
COO-
R
Structure de base d'un acide aminé
Chaîne latérale ou radical R
R
Carbone α
Hydrogène α
+H3N — CH — C=O
O-
Groupement α aminé
Groupement carboxyl

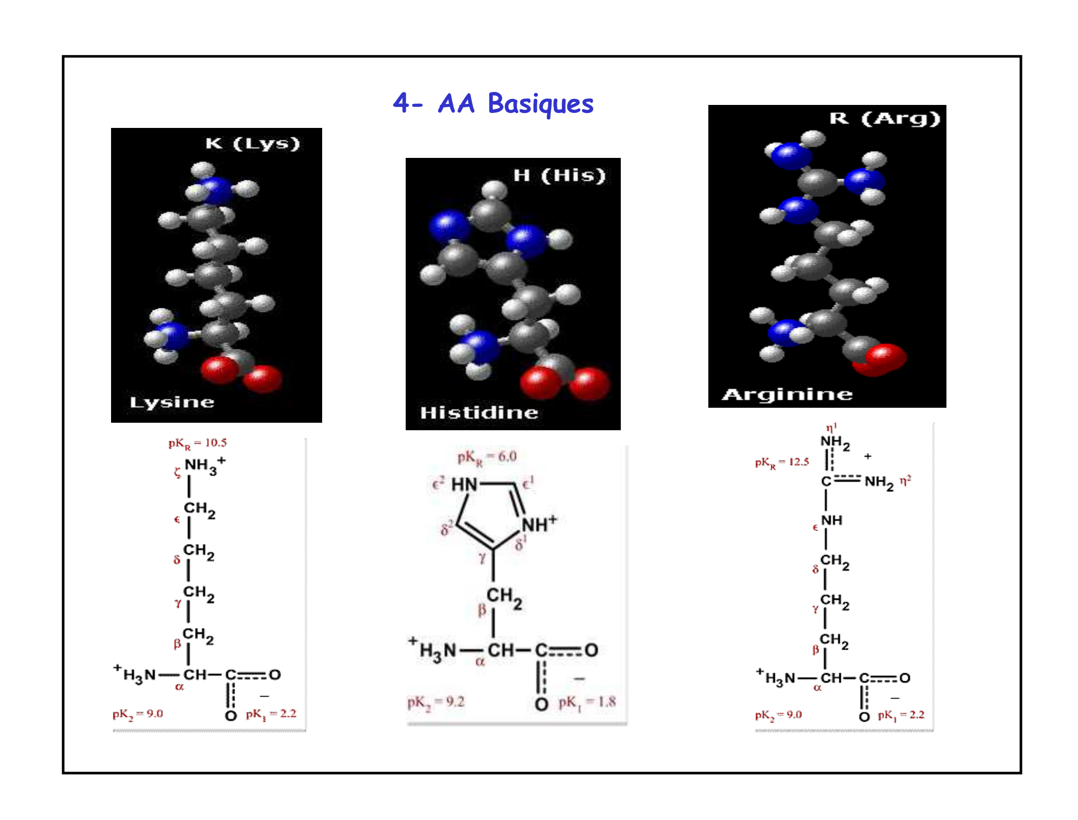
Acide aminé	Code à 3 lettres	Code à une lettre
Alanine	Ala	A
Glycine	Gly	G
Leucine	Leu	L
Proline	Pro	P
Thréonine	Thr	T
Cystéine	Cys	C
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Méthionine	Met	M
Sérine	Ser	S
Valine	Val	V

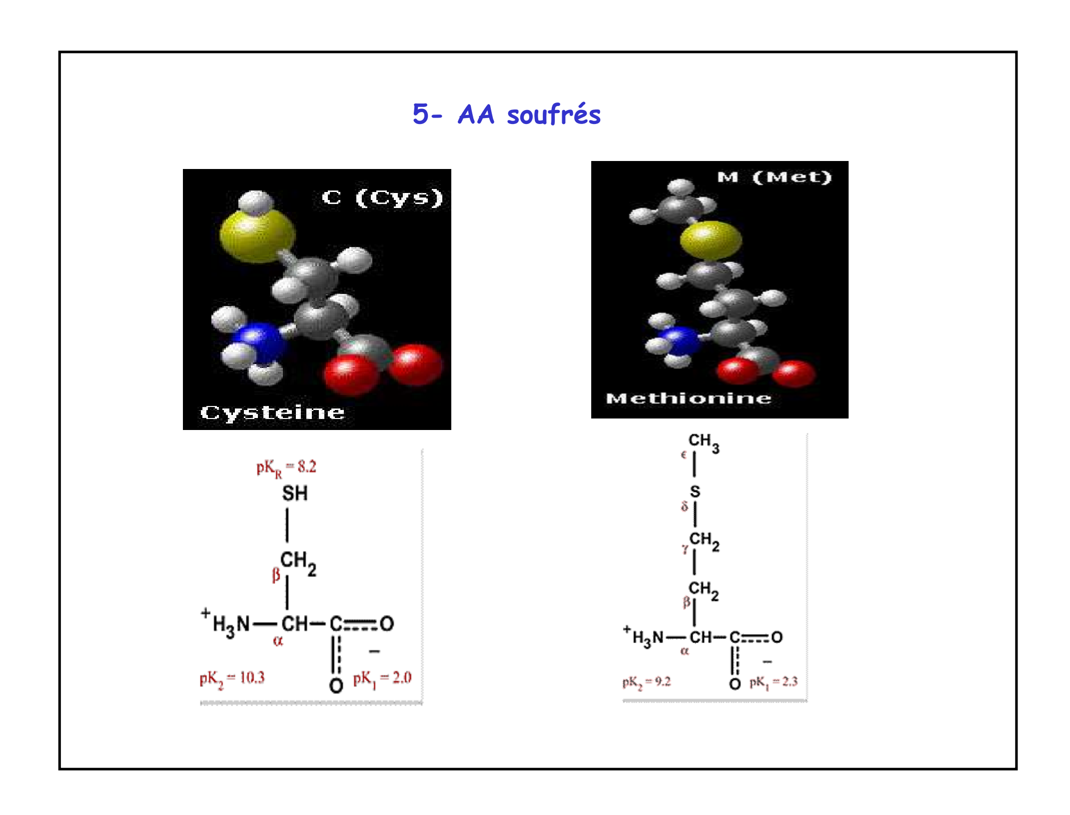
Acide aminé	Code à 3 lettres	Code à une lettre
Arginine	Arg	R
Phénylalanine	Phe	F
Tyrosine	Tyr	Y
Tryptophane	Trp	W
Asparagine	Asn	N
Acide glutamique	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Lysine	Lys	K
Acide aspartique	Asp	D

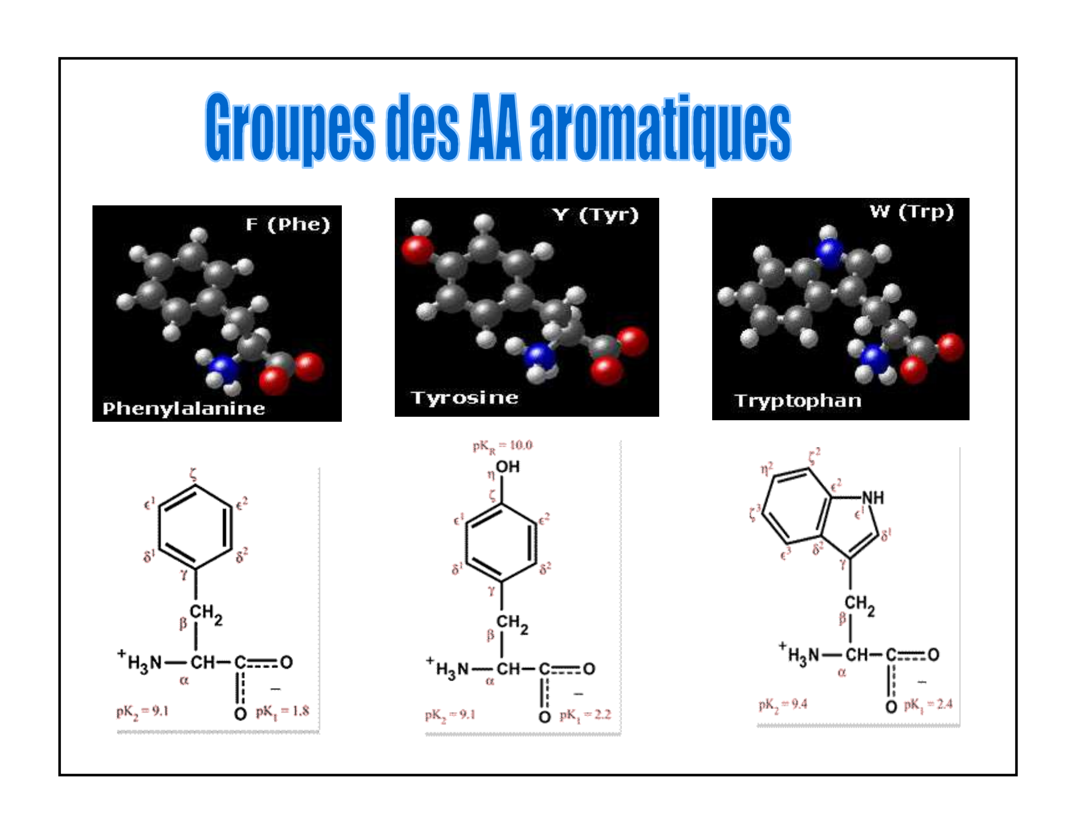

Groupe des acides aminés aliphatiques
1- AA Neutres
G (Gly)
A (Ala)
V (val)
L (Leu)
I (Ile)
Glycine
Alanine
Valine
Leucine
Isoleucine
pK2 = 9.6
pK1 = 2.3
pK2 = 9.7
pK1 = 2.3
pK2 = 9.6
pK1 = 2.3
pK2 = 9.6
pK1 = 2.4
pK2 = 9.7
pK1 = 2.4


2- AA Hydroxylés
S (Ser)
T (Thr)
Y (Tyr)
Serine
Threonine
Tyrosine
pKR = 10.0
pK2 = 9.2
pK1 = 2.2
pK2 = 9.6
pK1 = 2.1
pK2 = 9.1
pK1 = 2.2

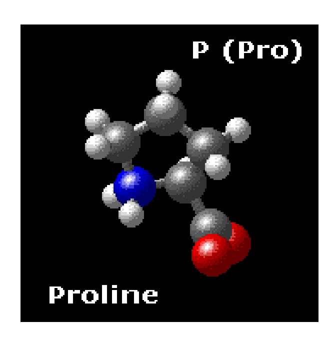

3- AA dicarboxyliques_
D (Asp)
Aspartic acid
E (Glu)
Glutamic acid
N (Asn)
Asparagine
Q (Gln)
Glutamine
pK_R = 3.7
pK_2 = 9.6
pK_1 = 1.9
pK_R=4.3
pK_2=9.7
pK_1=2.2
pK_2 = 8.8
pK_1 = 2.0
pK_2 = 9.1
pK_1 = 2.2


4- AA Basiques
K (Lys)
Lysine
H (His)
Histidine
R (Arg)
Arginine
pK_R = 10.5
pK_2 = 9.0
pK_1 = 2.2
pK_R = 6.0
pK_2 = 9.2
pK_1 = 1.8
pK_R = 12.5
pK_2 = 9.0
pK_1 = 2.2


5- AA soufrés
C (Cys)
Cysteine
M (Met)
Methionine
pKR = 8.2
SH
CH2
+H3N—CH—C=O
pK2 = 10.3
pK1 = 2.0
CH3
S
CH2
CH2
+H3N—CH—C=O
pK2 = 9.2
pK1 = 2.3


Groupes des AA aromatiques
F (Phe)
Phenylalanine
Y (Tyr)
Tyrosine
W (Trp)
Tryptophan
CH2
+H3N—CH—C=O
pK2 = 9.1
pK1 = 1.8
pKR = 10.0
OH
CH2
+H3N—CH—C=O
pK2 = 9.1
pK1 = 2.2
NH
CH2
+H3N—CH—C=O
pK2 = 9.4
pK1 = 2.4

Groupe des AA à fonction amine secondaire





La Proline et l'Hydroxyproline : AA a-aminés dérivés de la pyrrolidine, solubles dans l'alcool éthylique, la Proline se trouve dans les Prolamines , l'Hydroxyproline dans les collagènes.

Classement des acides aminés

- Acides aminés **simples** : Gly , Ala
- Acides aminés **acides** : Asp , Glu
- Acides aminés **amides** : Asn , Gln
- Acides aminés **basiqes** : Arg, Lys, His
- Acides aminés **alcools** : Ser , Thr
- Acides aminés **soufrés** : Cys, Met
- Acides aminés **aliphatiques ramifiés** : Val, Leu, Ile
- Acides aminés **aromatiques** : Phe, Tyr, Trp
- **Amine** secondaire : Pro

Les acides aminés essentiels sont : valine, leucine, isoleucine lysine, méthionine, thréonine, phénylalanine et tryptophane .

Fonctions des acides aminés

Les acides aminés peuvent être les précurseurs de composés spécifiques biologiquement actifs.

Participer à la synthèse des protéines .

Précurseurs des bases purique et pyrimidique (**Aspartate, glycine** et **glutamate)**

Substrats énergétiques: leur oxydation contribue à 20 % de l'énergie produite par l'organisme.

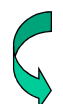
Précurseurs d'hormones et de médiateurs:
- **Phénylalanine** et **tyrosine** sont les précurseurs des hormones thyroïdiennes et des catécholamines.
- **Tryptophane** est le précurseur de la sérotonine.
- **Histidine** est un précurseur de l'histamine.
- **Glutamate** est un précurseur du GABA (neurotransmetteur).
- **Arginine** est le précurseur de l'oxyde nitrique radicalaire, responsable de l'activité antitumorale des macrophages.

Ionisation des groupes acide-base des AA

1-Notion d'acide-base

Un acide est un donneur de proton, une base est un accepteur de proton, chaque acide possède une base conjuguée:

$$\text{Acide} \rightleftarrows \text{Base} + H^+$$



Les acides aminés sont des acides faibles, ils sont ionisés en solution, Les acides aminés sont appelés diionique amphotères. L'ionisation varie avec le pH : il s'établie un équilibre réel entre l'acide et sa base conjuguée.

$$HA \rightleftarrows H^+ + A^-$$

Notion de pH

On introduit le terme de pH pour exprimer la concentration en ions H^+ très faible des solutions biologiques:

$$pH = -\log [H^+]$$

Pour les acides faibles (AA) , le pH de la solution est représenté par l'équation d'Henderson-Hasselbalch

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad , \quad \frac{[base]}{[acide]} \quad \frac{[accepteur\ H+]}{[donneur\ H+]}$$

Le pKa mesure la tendance d'un groupement acide à libérer un proton H^+, il correspond à la demi dissociation de la fonction acide

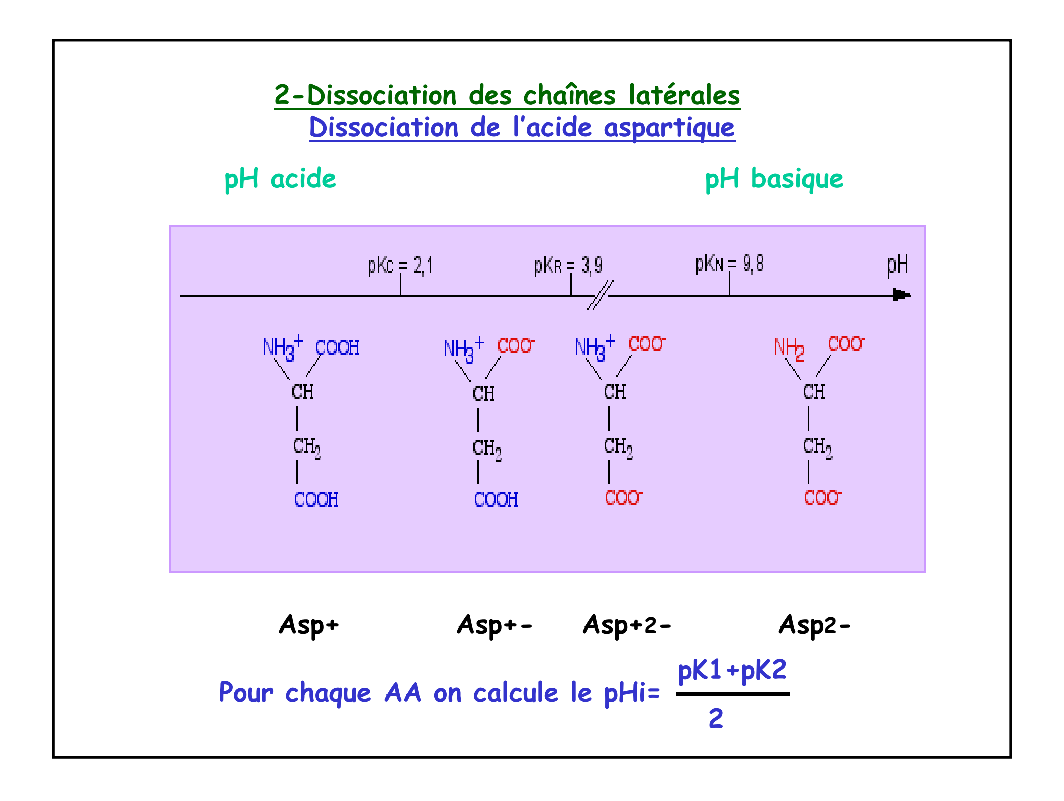
Dissociation d'un AA

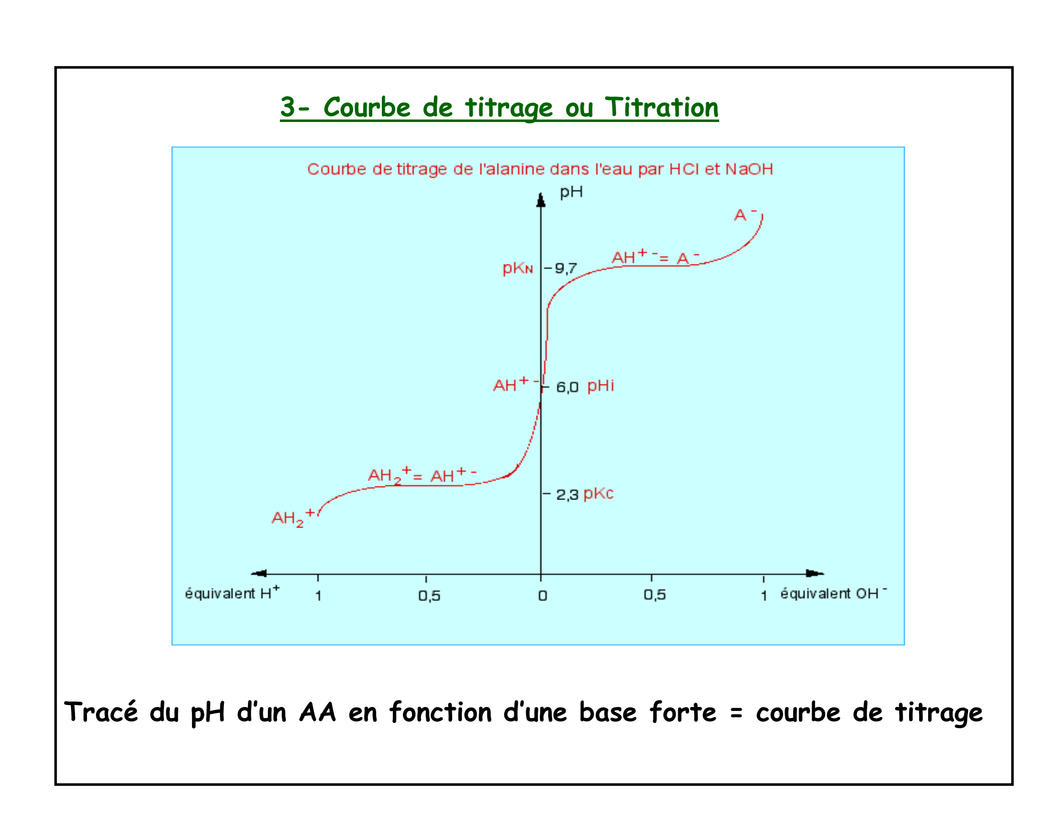
NH_2/NH_3^+ $COOH/COO^-$
pKN ≃ 9 α CH pKc ≃ 2
R

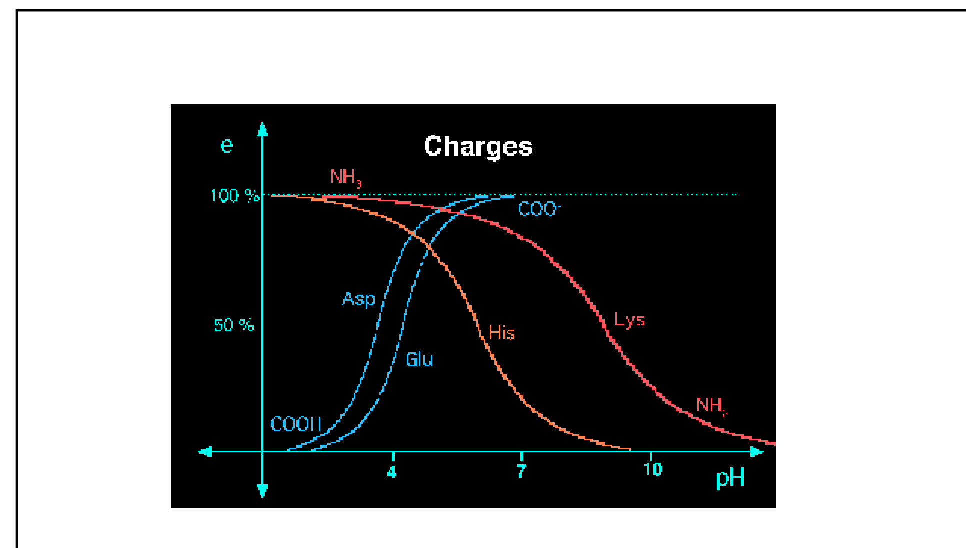
les acides aminés existent en solution aqueuse, sous 3 formes:

$$^+H_3N - C(H)(R_1) - COOH \underset{}{\overset{K1}{\rightleftharpoons}} {}^+H_3N - C(H)(R_1) - COO^- + H^+ \underset{}{\overset{K2}{\rightleftharpoons}} NH_2 - C(H)(R_1) - COO^- + H^+$$

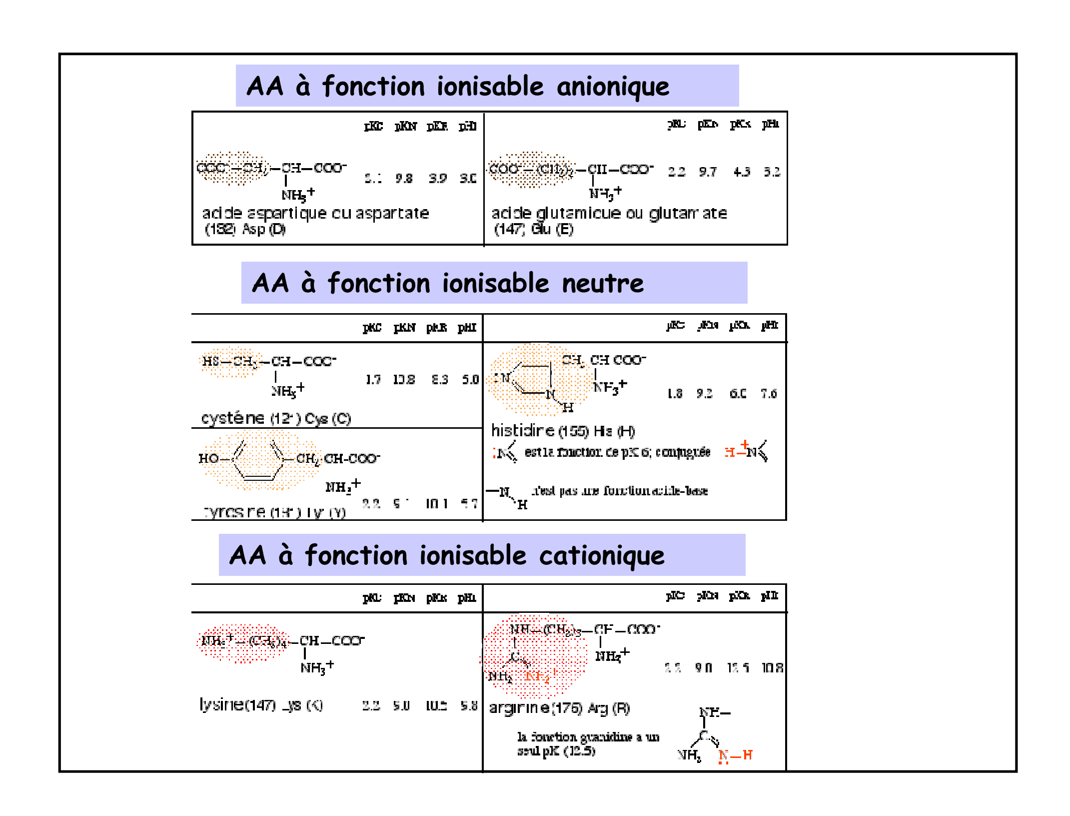
Forme cationique	Forme neutre(Zwitterion)	Forme anionique
milieu acide	point isoélectrique	milieu basique


2-Dissociation des chaînes latérales
Dissociation de l'acide aspartique
pH acide
pH basique
pKc = 2,1
pKR = 3,9
pKN = 9,8
pH
NH3+ COOH
CH
CH2
COOH
NH3+ COO-
CH
CH2
COOH
NH3+ COO-
CH
CH2
COO-
NH2 COO-
CH
CH2
COO-
Asp+
Asp+-
Asp+2-
Asp2-
Pour chaque AA on calcule le pHi= pK1+pK2 / 2


3- Courbe de titrage ou Titration
Courbe de titrage de l'alanine dans l'eau par HCl et NaOH
pH
A -
AH+ - = A -
pKN
9,7
AH+ -
6,0 pHi
AH2+ = AH+ -
2,3 pKc
AH2+
équivalent H+
1
0,5
0
0,5
1
équivalent OH-
Tracé du pH d'un AA en fonction d'une base forte = courbe de titrage



Les fonctions ionisables des AA sont d'autant plus protonnées que le milieu est plus riche en ions H+ (le pH est plus faible).



Chaîne latérale polaire sans fonction ionisable

	pKC	pKN	pKR	pHI
$HO-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$ sérine (105) Ser (S)	2.2	9.2		5.7
$CH_3-CH(HO)-CH(NH_3^+)-COO^-$ thréonine (119) Thr (T)	2.6	10.4		6.5
$NH_2-CO-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$ asparagine (132) Asn (N)	2.0	8.8		5.4
$NH_2-CO-(CH_2)_2-CH(NH_3^+)-COO^-$ glutamine (146) Gln (Q)	2.2	9.1		5.7

ACIDES AMINES : Formules à pH 7, (Masse moléculaire), Sigles pKC (α-carboxyl), pKN (α-amino), pKR (chaîne latérale), pHI (pH isoélectrique)

Chaîne latérale non polaire

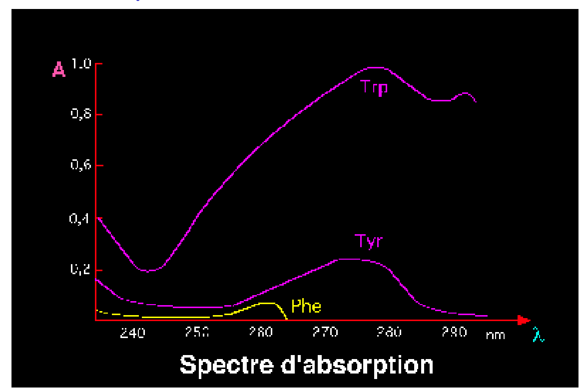
	pKC	pKN	pKR	pHI
$H-CH(NH_3^+)-COO^-$ glycine (75) Gly (G)	2.3	9.6		6.0
$CH_3-CH(NH_3^+)-COO^-$ alanine (89) Ala (A)	2.3	9.7		6.0
$(CH_3)_2CH-CH(NH_3^+)-COO^-$ valine (117) Val (V)	2.3	9.6		6.0
$(CH_3)_2CH-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$ leucine (131) Leu (L)	2.4	9.6		6.0
$CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH(NH_3^+)-COO^-$ isoleucine (131) Ile (I)	2.4	9.7		6.1
$CH_2-CH_2-CH_2-NH_2^+-CH-COO^-$ (cycle) proline (115) Pro (P)	2.0	10.6		6.3
$C_6H_5-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$ phénylalanine (165) Phe (F)	1.8	9.1		5.5
$CH_3-S-(CH_2)_2-CH(NH_3^+)-COO^-$ méthionine (149) Met (M)	2.3	9.2		5.8
indole$-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$ tryptophane (204) Trp (W)	2.4	9.4		5.9

Liste des 20 acides aminés représentés dans le code génétique

Nom	Code à 1 lettre	Code à 3 lettres	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	pI	pK_1 (-COOH)	pK_2 ($-NH_2$)	pK_R (-R)
Alanine	A	Ala	89.09	6.01	2.35	9.87	
Arginine	R	Arg	174.20	10.76	1.82	8.99	12.48
Asparagine	N	Asn	132.12	5.41	2.14	8.72	
Aspartate	D	Asp	133.10	2.85	1.99	9.90	3.90
Cystéine	C	Cys	121.16	5.05	1.92	10.70	8.18
Glutamate	E	Glu	147.13	3.15	2.10	9.47	4.07
Glutamine	Q	Gln	146.15	5.65	2.17	9.13	
Glycine	G	Gly	75.07	6.06	2.35	9.78	
Histidine	H	His	155.16	7.60	1.80	9.33	6.04

Isoleucine	I	Ile	131.17	6.05	2.32	9.76	
Leucine	L	Leu	131.17	6.01	2.33	9.74	
Lysine	K	Lys	146.19	9.60	2.16	9.06	10.54
Méthionine	M	Met	149.21	5.74	2.13	9.28	
Phénylalanine	F	Phe	165.19	5.49	2.20	9.31	
Proline	P	Pro	115.13	6.30	1.95	10.64	
Sérine	S	Ser	105.09	5.68	2.19	9.21	
Thréonine	T	Thr	119.12	5.60	2.09	9.10	
Tryptophane	W	Trp	204.23	5.89	2.46	9.41	
Tyrosine	Y	Tyr	181.19	5.64	2.20	9.21	10.46
Valine	V	Val	117.15	6.00	2.39	9.74	

Spectre d'absorption



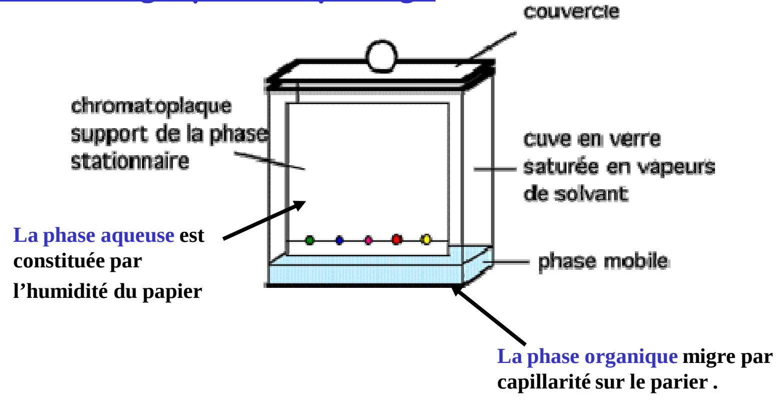
Les solutions AA sont incolores. Les AA aromatiques absorbent dans l'U.V. entre 260 et 280 nm. L'absorption ultraviolette des protéines provient de leur teneur en tryptophane et parfois en tyrosine.

L'absorption à 280 nm est due principalement aux noyaux phénols des tyrosines, qui sont plus fréquentes dans les protéines que le tryptophane, qui absorbe beaucoup plus à cette longueur d'onde.

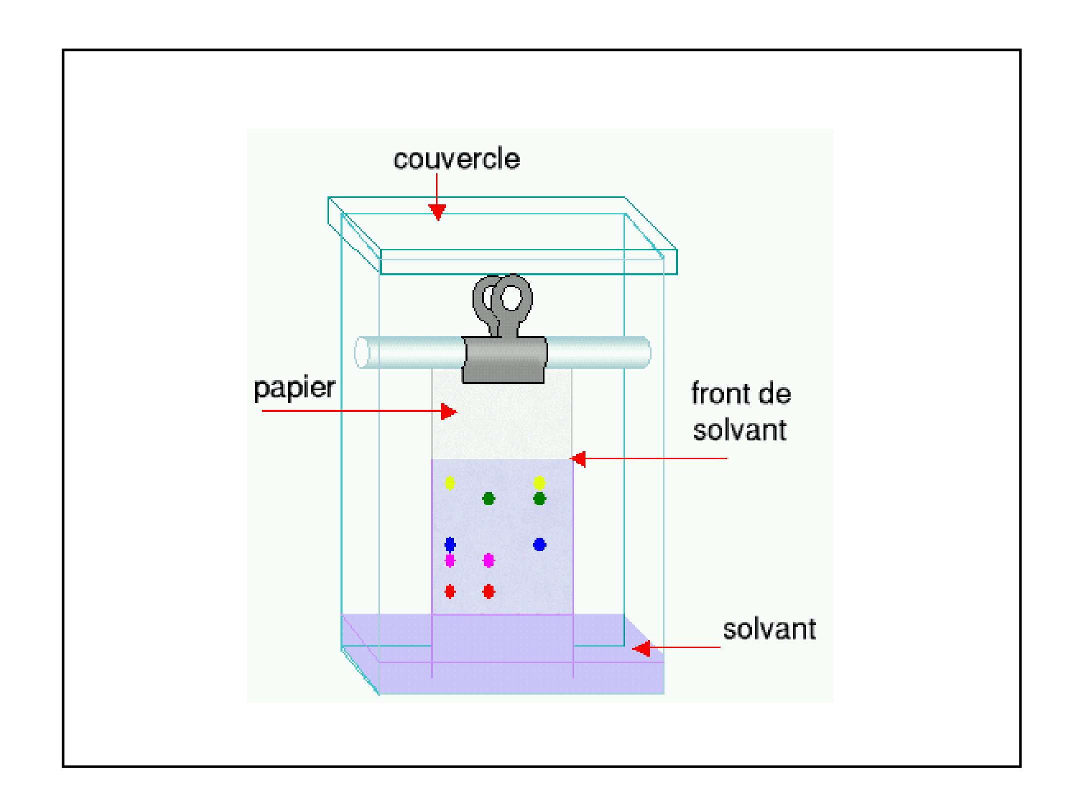
L'absorption de la lumière UV à 280 nm est caractéristique des protéines et sert à les doser.

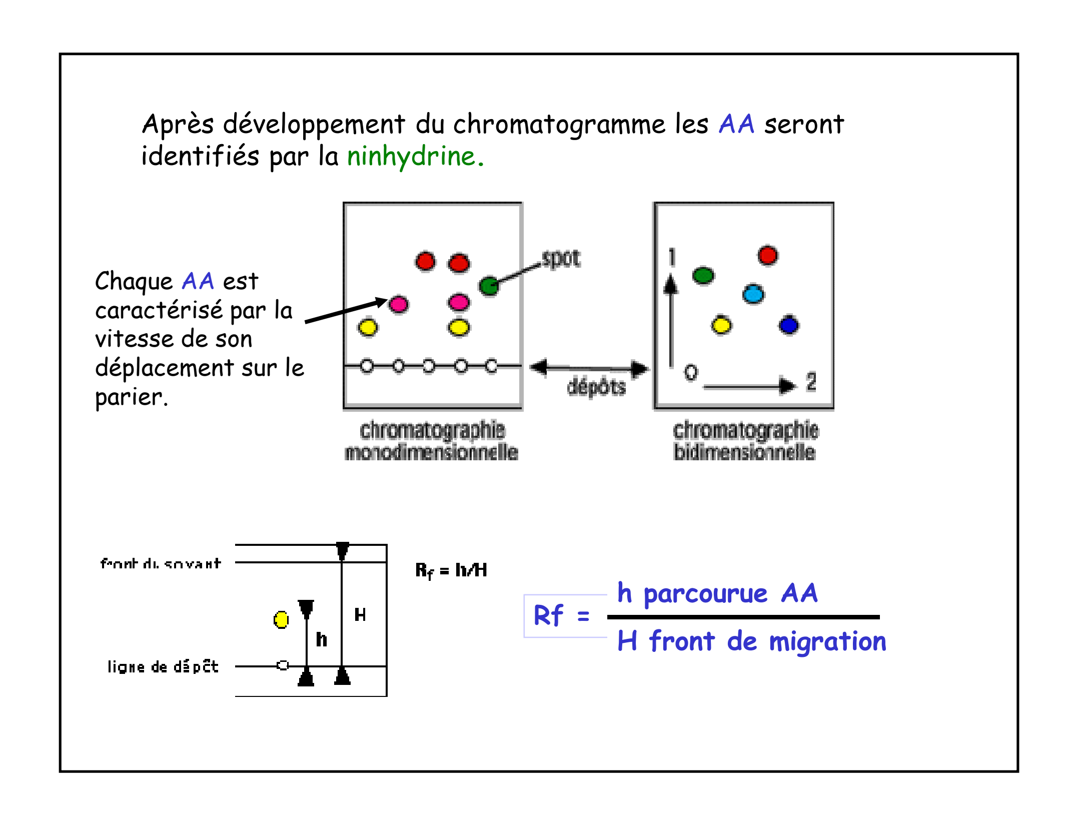
Méthodes de détection et de dosage des AA

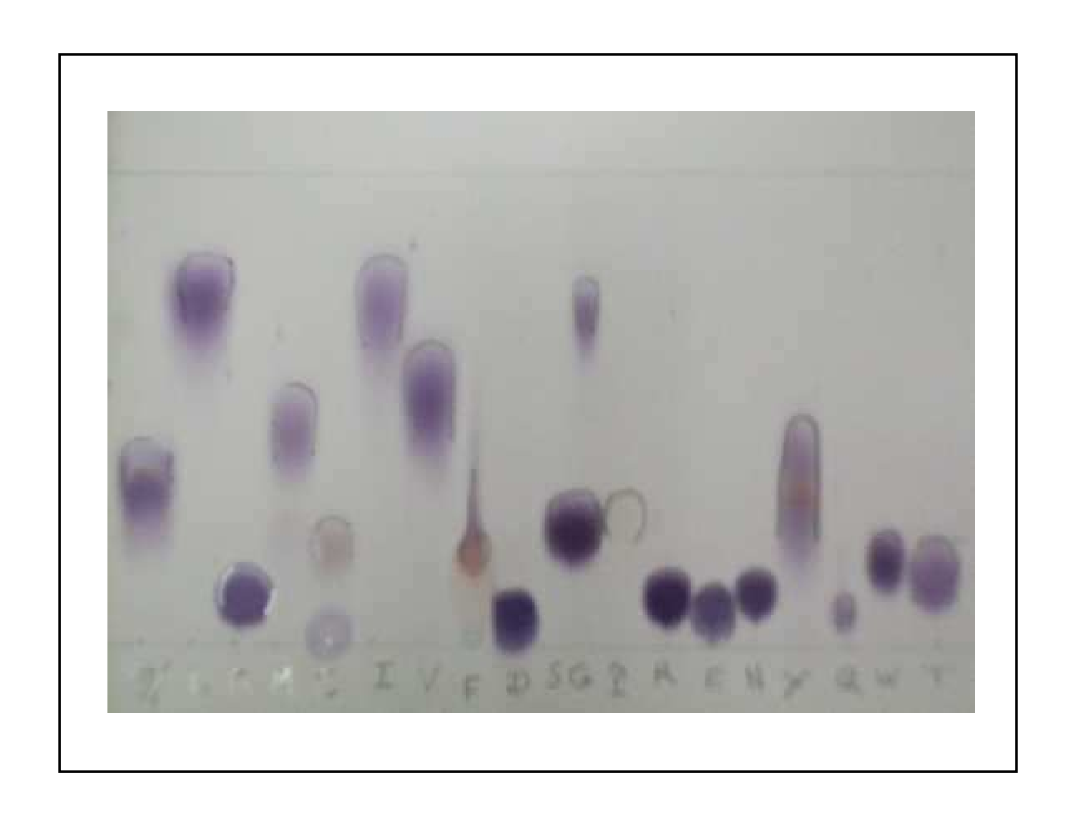
A-Chromatographie de partage

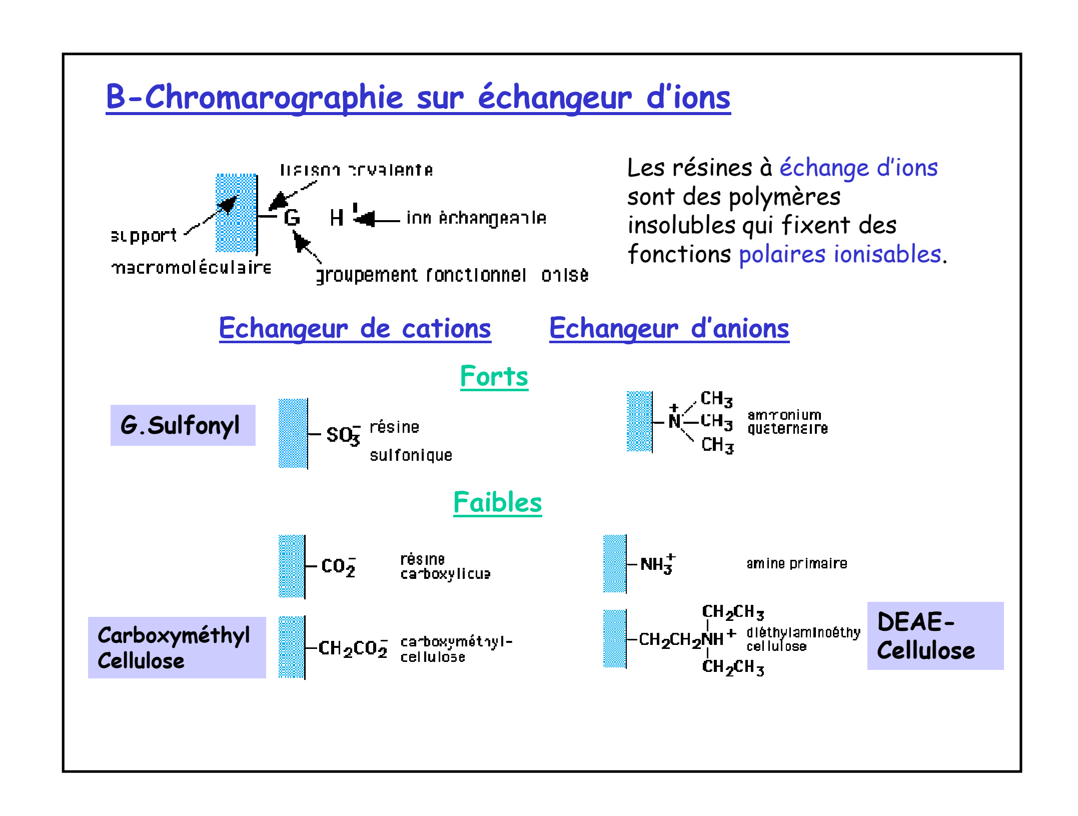


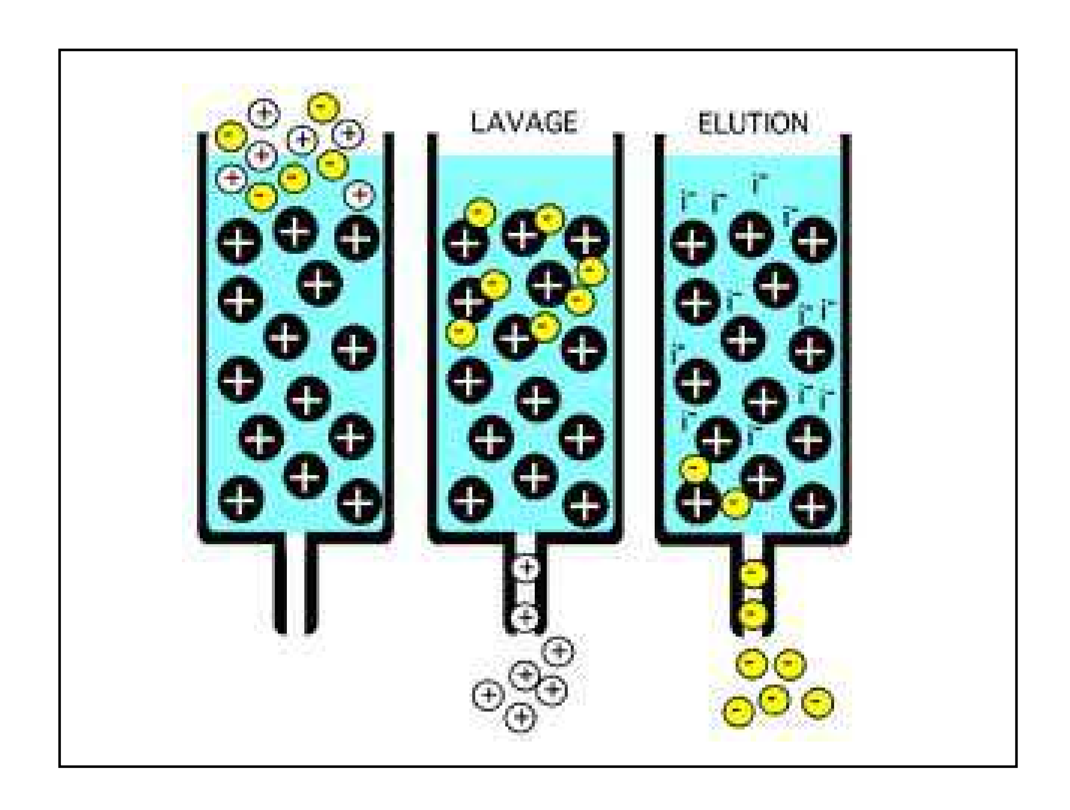
Dans la chromatographie sur papier, la phase aqueuse est constituée par l'humidité du papier (φse stationnaire), la phase organique (φse mobile) migre par capillarité sur le parier , entraînant les AA, ceux qui sont hydrophobes migrent plus rapidement que ceux qui sont hydrophiles.


couvercle
papier
front de solvant
solvant

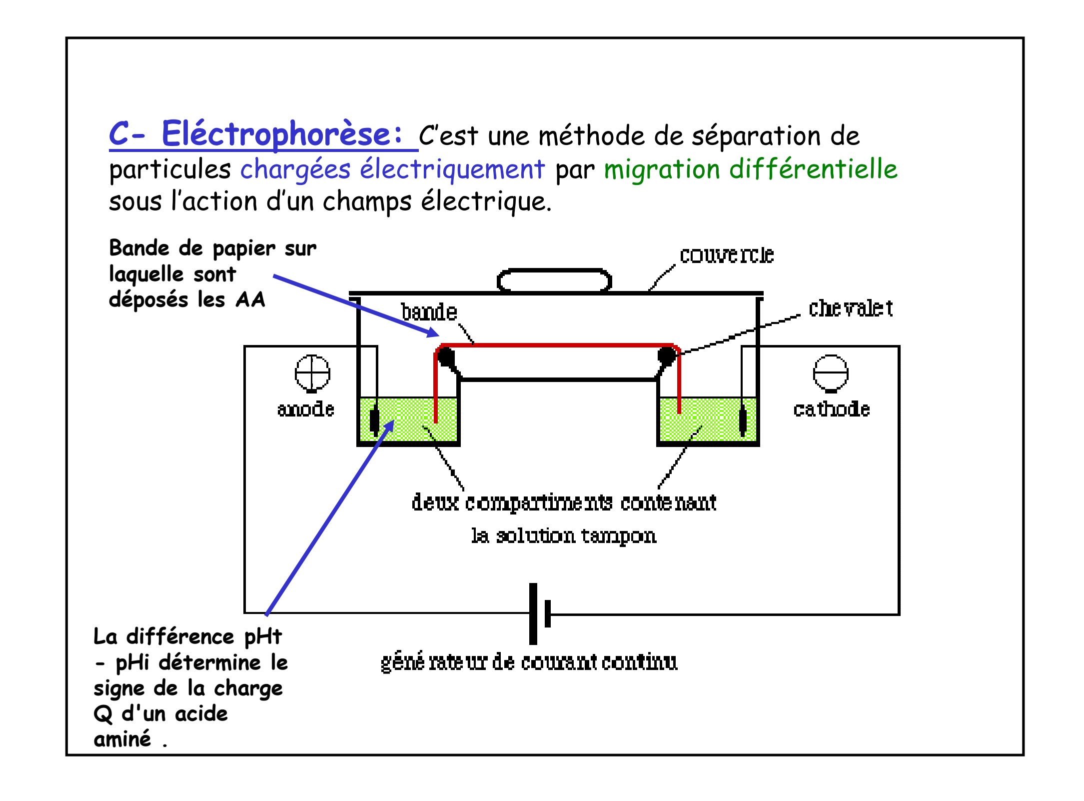

Après développement du chromatogramme les AA seront identifiés par la ninhydrine.
Chaque AA est caractérisé par la vitesse de son déplacement sur le parier.
spot
dépôts
1
0
2
chromatographie monodimensionnelle
chromatographie bidimensionnelle
H
h
$R_f = h/H$
Rf = h parcourue AA / H front de migration




B-Chromarographie sur échangeur d'ions
liaison covalente
support
macromoléculaire
G
H
ion échangeable
groupement fonctionnel ionisé
Les résines à échange d'ions sont des polymères insolubles qui fixent des fonctions polaires ionisables.
Echangeur de cations
Echangeur d'anions
Forts
G.Sulfonyl
SO_3^-
résine sulfonique
$N^+(CH_3)_3$
ammonium quaternaire
Faibles
CO_2^-
résine carboxylique
NH_3^+
amine primaire
Carboxyméthyl Cellulose
$-CH_2CO_2^-$
carboxyméthyl-cellulose
$-CH_2CH_2NH^+(CH_2CH_3)_2$
diéthylaminoéthyl cellulose
DEAE-Cellulose



C- Eléctrophorèse: C'est une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champs électrique.



D-Propriétés associées à certains radicaux

1- La fonction SH de la cystéine (Fonction Thiol)

Oxydation performique:

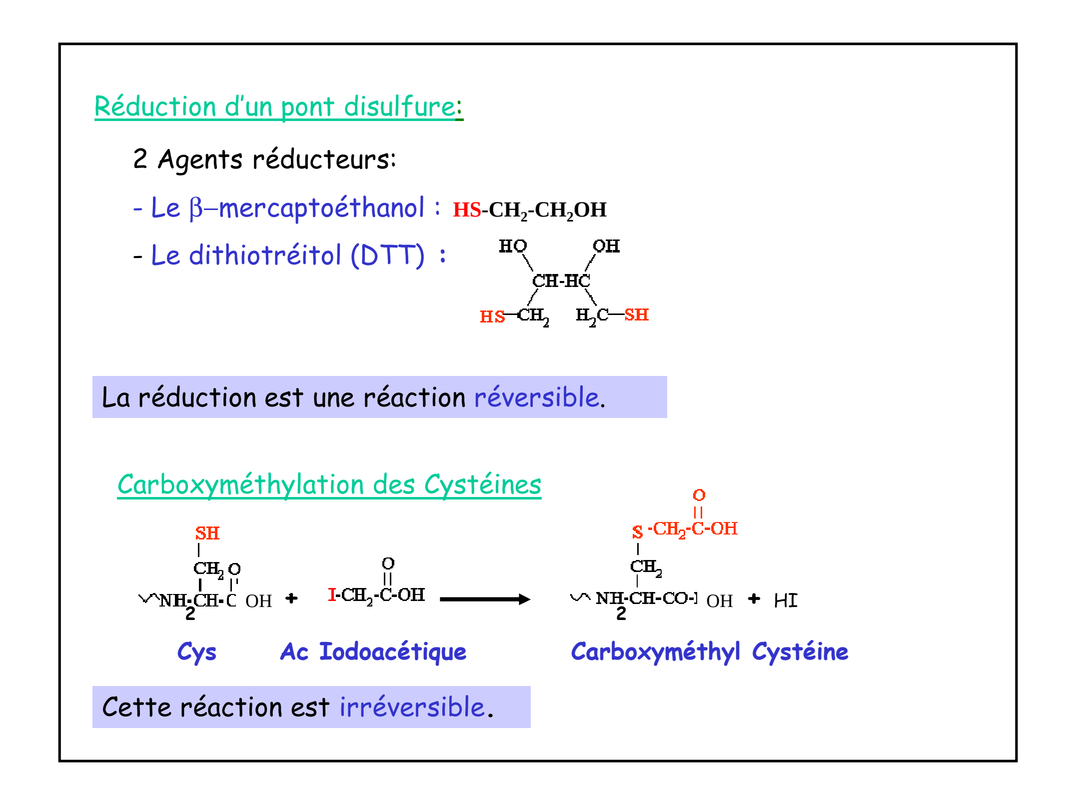
Cys : $\sim NH_2\text{-}CH(CH_2SH)\text{-}C(=O)\ OH$ → $\sim NH_2\text{-}CH(CH_2SO_3H)\text{-}C(=O)\ OH$: Acide sulfonique

(Acide performique)

Oxydation douce par l'air: (Formation de pont disulfure)

2 $\sim NH_2\text{-}CH(CH_2SH)\text{-}C(=O)\ OH$ + $1/2O_2$ ⇄ R1-S-S-R2 + H2O

2 Cys — Pont disulfure



2-Thioéther de la Méthionine : (Réaction au Bromure de cyanogène)

BrCN

~~~ NH–CH–CO–NH– (CH_2–CH_2–S–CH_3) → –NH–CH–C(=O)–NH–~~~ (CH_2–CH_2–Br^- S^+–CN, CH_3)

Met

–NH–CH–C=N^+H– (cycle H_2C–CH_2–O) + H_3C–S–CN + Br^-

$2H_2O$ → ~~~ NH–CH–COOH + H_2N~~~ (CH_2–CH_2OH)

Homosérine lactone

Cette réaction est spécifique des méthionines.

3-L'hydroxyl de la Sérine

H_2N-CH-COOH (CH_2–OH) + HO-P(O^-)(=O)-O^- → H_2N-CH-COOH (CH2–O–P(=O)(O)–O^-) + H_2O

Sérine

Ac phosphorique

Sérine phosphorylée ou phosphosérine

Certaines sérines sont phosphorylées naturellement.
~~~

Les Peptides

A- Formation de la liaison peptidique

Un peptide : combinaison de 2 ou plusieurs AA par des liaisons amides particulières = liaisons peptidiques

Liaison peptidique

Nt Ct

Chaîne peptidique

aa n° 1 + aa n° 2 → dipeptide

H_2O

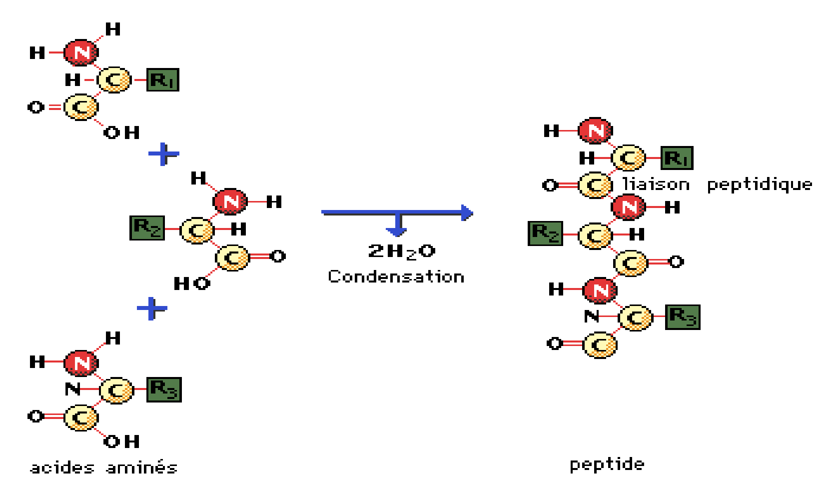
liaison peptidique

aa 1 aa 2 aa 3 aa 4

extrémité N-terminale (amino-terminale)

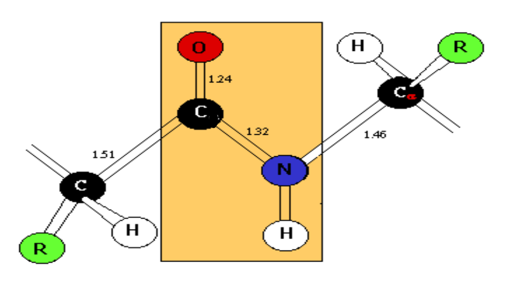
extrémité C-terminale (carboxy-terminale)

Entre l'extrémité Nt et Ct du peptide, ce qui reste de chaque AA après perte d'une molécule d'eau pour former une liaison peptidique s'appelle un résidu d'aminoacide.



Les oligopeptides (dipeptides et tripeptides) ne donnent pas de réaction au Biuret, qui n'est positive que si le peptide contient au moins 4 AA (Coloration bleu-violacée)

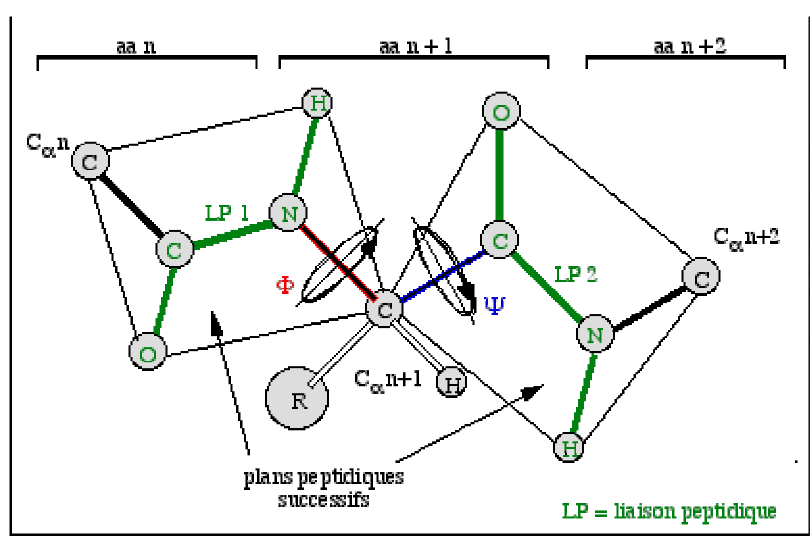
B- Structure de la chaîne peptidique



Configuration Trans de 2 résidus successifs

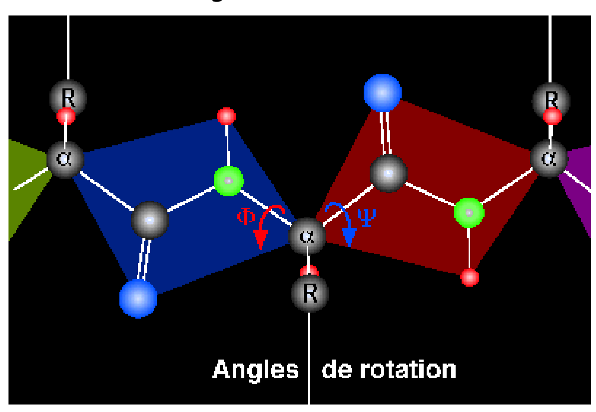
Les atomes participant à la liaison peptidique sont Cα , CO et NH . La liaison peptidique peut exister sous la forme cis ou trans .Le placement des R d'AA sur les Cα n'est possible que dans la configuration trans. La liaison carbone-azote possède un caractère partiel de double liaison: le motif de la liaison peptidique est plan.

L'agencement spatial de la chaîne polypeptidique



Chaque plan comprend six atomes. Les plans sont articulés entre eux autour des carbones alpha par libre rotation : angle phi (Φ, Cα-N) et psi (Ψ, Cα-C) du même aa.

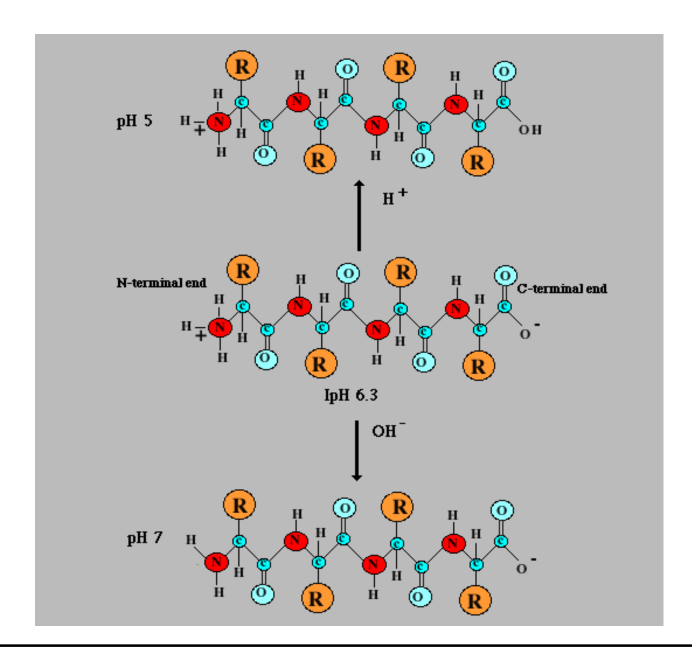
Le squelette polypeptidique apparaît comme une succession de plans, limitant énormément les degrés de liberté de la structure.



Rotation de 2 liaisons peptidiques successives autour d'un même atome de Cα.

Si les angles sont égaux, la chaîne peptidique prend une forme organisée (Structure ordonnée), sinon la structure est désordonnée (pelote statistique)

Les peptides sont des polymères chargés



Méthodes d'analyse de la séquence peptidique

A- Composition globale en AA:

Elle peut être déterminée après HAT: -coupe les l. peptidiques
-détruit le Trp
(HCl 5.6N à 100°pd 24 à 72h) -transforme Asn en Asp et Gln en Glu

L'établissement de la séquence des AA d'une chaîne peptidique comprend plusieurs étapes d'hydrolyses (chimiques ou enzymatiques). L'identification et le dosage des AA constitutifs s'effectuera par chromatographie sur résine échangeuse d'ion

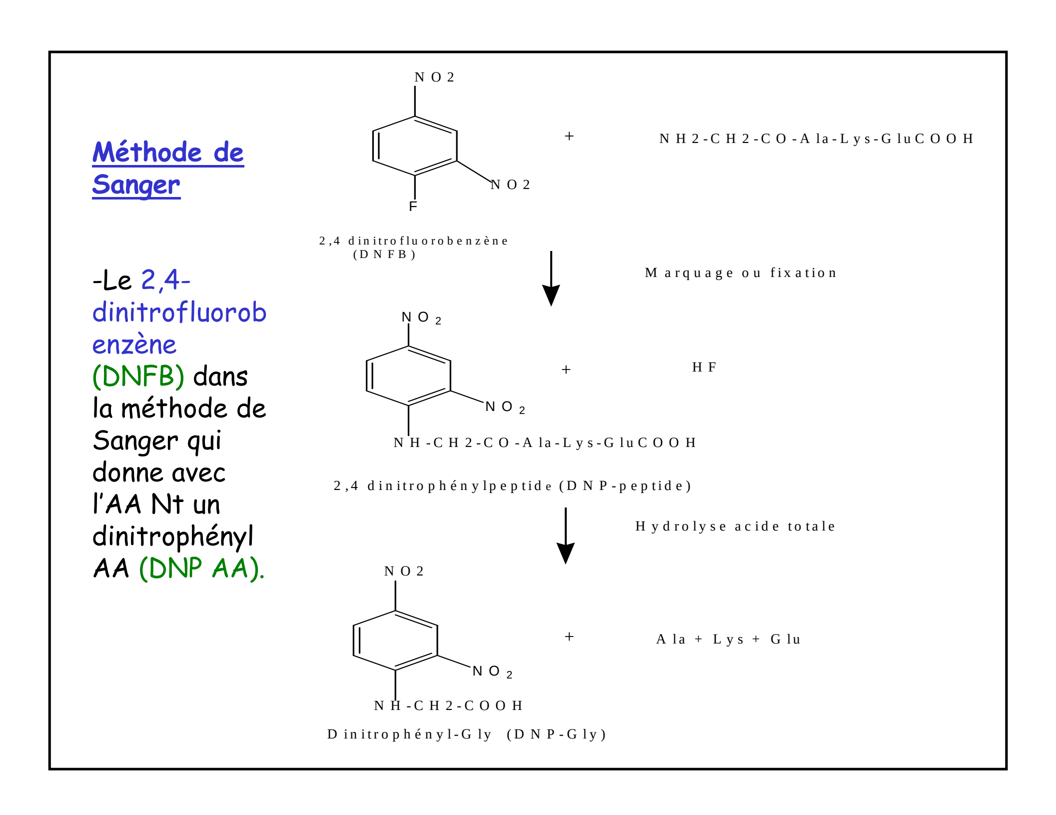
B- Détermination du résidu N-terminal

*Les réactifs chimiques:

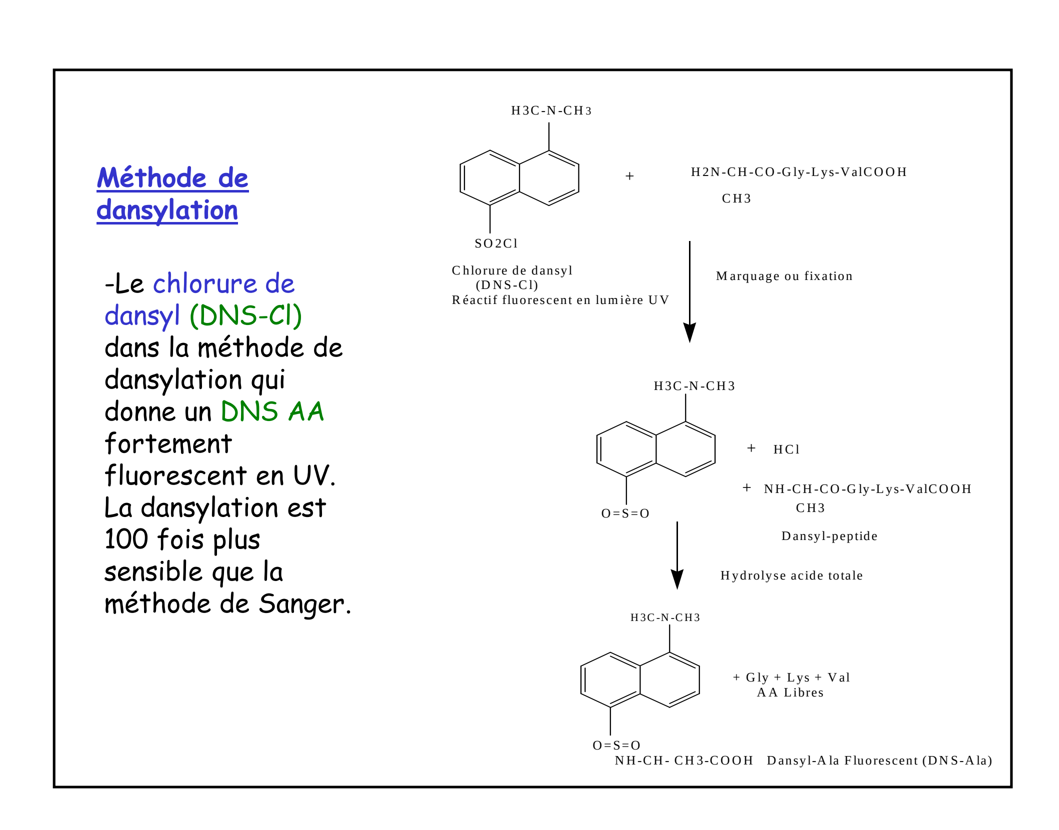
-Le 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB) ⟶ (DNP AA).

-Le chlorure de dansyl (DNS-Cl) ⟶ DNS AA

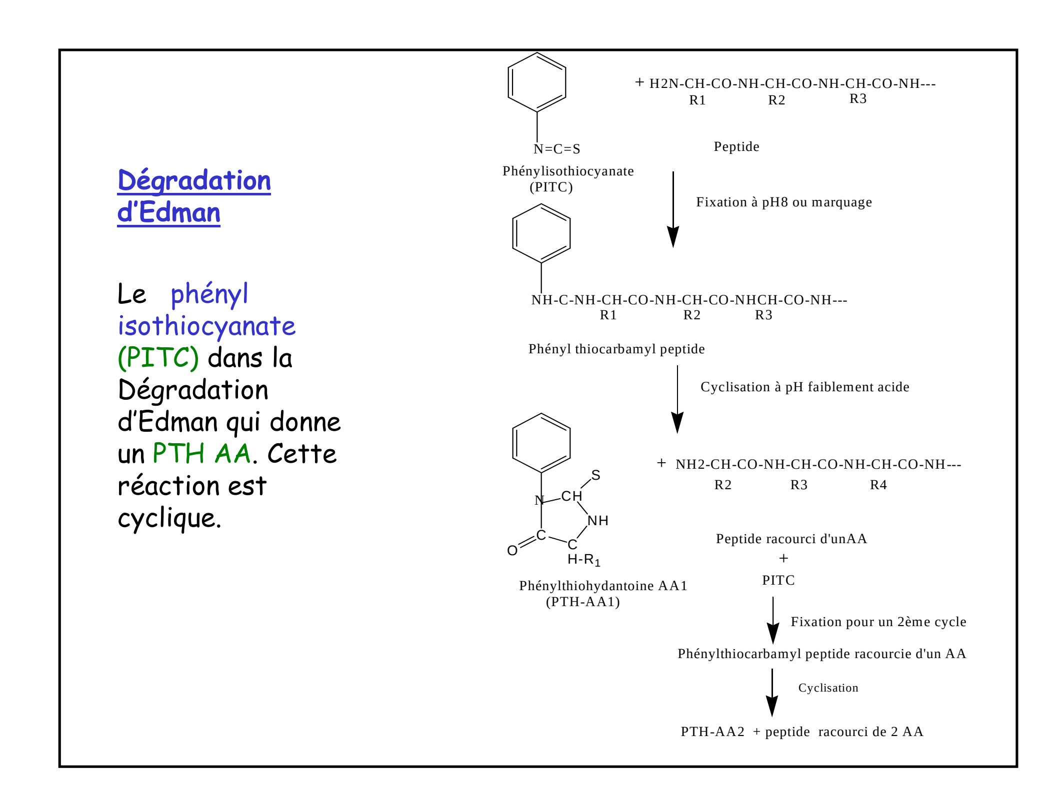
-Le phénylisothiocyanate (PITC) ⟶ PTH AA. Cette réaction est cyclique.

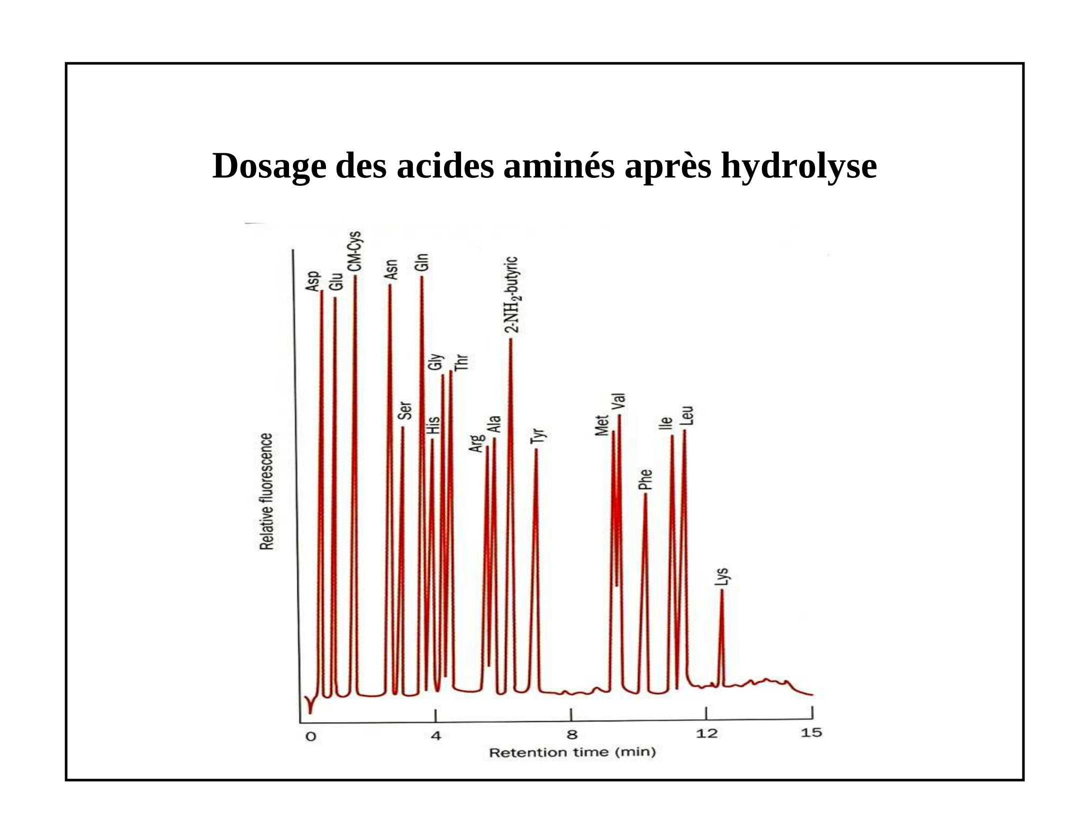


Méthode de Sanger
-Le 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB) dans la méthode de Sanger qui donne avec l'AA Nt un dinitrophényl AA (DNP AA).
NO2
NO2
F
+
NH2-CH2-CO-Ala-Lys-GluCOOH
2,4 dinitrofluorobenzène
(DNFB)
Marquage ou fixation
NO2
NO2
+
HF
NH-CH2-CO-Ala-Lys-GluCOOH
2,4 dinitrophénylpeptide (DNP-peptide)
Hydrolyse acide totale
NO2
NO2
+
Ala + Lys + Glu
NH-CH2-COOH
Dinitrophényl-Gly (DNP-Gly)



Méthode de dansylation
-Le chlorure de dansyl (DNS-Cl) dans la méthode de dansylation qui donne un DNS AA fortement fluorescent en UV. La dansylation est 100 fois plus sensible que la méthode de Sanger.
H3C-N-CH3
SO2Cl
+
H2N-CH-CO-Gly-Lys-ValCOOH
CH3
Chlorure de dansyl
(DNS-Cl)
Réactif fluorescent en lumière UV
Marquage ou fixation
H3C-N-CH3
O=S=O
+ HCl
+ NH-CH-CO-Gly-Lys-ValCOOH
CH3
Dansyl-peptide
Hydrolyse acide totale
H3C-N-CH3
+ Gly + Lys + Val
AA Libres
O=S=O
NH-CH- CH3-COOH
Dansyl-Ala Fluorescent (DNS-Ala)


Dégradation d'Edman
Le phényl isothiocyanate (PITC) dans la Dégradation d'Edman qui donne un PTH AA. Cette réaction est cyclique.
N=C=S
Phénylisothiocyanate (PITC)
+ H2N-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH-CO-NH---
R1 R2 R3
Peptide
Fixation à pH8 ou marquage
NH-C-NH-CH-CO-NH-CH-CO-NHCH-CO-NH---
R1 R2 R3
Phényl thiocarbamyl peptide
Cyclisation à pH faiblement acide
S
N CH
NH
O C C
H-R1
Phénylthiohydantoine AA1 (PTH-AA1)
+ NH2-CH-CO-NH-CH-CO-NH-CH-CO-NH---
R2 R3 R4
Peptide racourci d'unAA
+
PITC
Fixation pour un 2ème cycle
Phénylthiocarbamyl peptide racourcie d'un AA
Cyclisation
PTH-AA2 + peptide racourci de 2 AA


Dosage des acides aminés après hydrolyse
Relative fluorescence
Asp
Glu
CM-Cys
Asn
Gln
Ser
His
Gly
Thr
Arg
Ala
2:NH2-butyric
Tyr
Met
Val
Phe
Ile
Leu
Lys
0
4
8
12
15
Retention time (min)

* Méthode enzymatique utilisant les aminopeptidases A et N qui sont spécifiques des AA N-terminaux.

C- Détermination du résidu C-terminal

-Méthode chimique: - par l'hydrazine anhydre à chaud :

$$NH_2\text{-}CH(R_1)\text{-}C(=O)\text{-}NH\text{-}CH(R_2)\text{-}COOH \xrightarrow{NH2\text{-}NH2} NH_2\text{-}CH(R_1)\text{-}C(=O)\text{-}NH\text{-}NH_2 + NH2\text{-}CH(R_2)\text{-}COOH$$

AA Ct

- Réduction par le Borohydrure de Lithium :

$$\text{----}Rn\text{-}CH(COOH)\text{-}NH_2 \xrightarrow{LiBH4} \text{--}\ Rn\text{-}CH(NH2)\text{-}CH_2\text{-}OH + H2O$$

-Méthode enzymatique:

Les Carboxypeptidase A ou B sont des exopeptidases qui libèrent l'AA en Ct .

D-Hydrolyse partielle des chaînes

- Digestion enzymatique: Endopeptidases spécifiques:
  - Trypsine ⟶ Arg et Lys
  - Chymoptrypsine ⟶ les AA aromatiques: Phe, Tyr, Trp.
  - Clostripaïne ⟶ Arg
  - Protéase de staphylocoque ⟶ Glu
  - Thermolysine ⟵ Leu, Ile, Tyr

- Méthode chimique:

- Le BrCN qui coupe après la Met et la transforme en homosérine.

A- les Hormones Peptidiques

Les hormones peptidiques sont une classe de peptides sécrétés dans la circulation sanguine qui ont des fonctions endocrine chez les animaux.

1- Hormones Hypophysaires:

° La vasopressine : action antidiurétique, elle diminue le volume des urines en augmentant la perméabilité à l'eau du tube collecteur.

COOH—Cys—Tyr—Phe—Glu—Asp—Cys—Pro—Arg—Gly—NH2

Vasopressine: 9AA

° ACTH : hormone adrénocorticotrope, formée de 39 résidus (PM=4500). Les résidus N et C terminaux sont protégés.

2- Hormones Hypothalamiques:

° La somatostatine:
est une hormone polypeptidique. Formée de 2 peptides : une chaîne de 14 AA , l'autre de 28.
La somatostatine est sécrétée principalement par les cellules de l'hypothalamus. Elle a une action inhibitrice sur l'hormone de croissance et agit également sur le pancréas endocrine en inhibant la sécrétion de l'insuline et du glucagon.

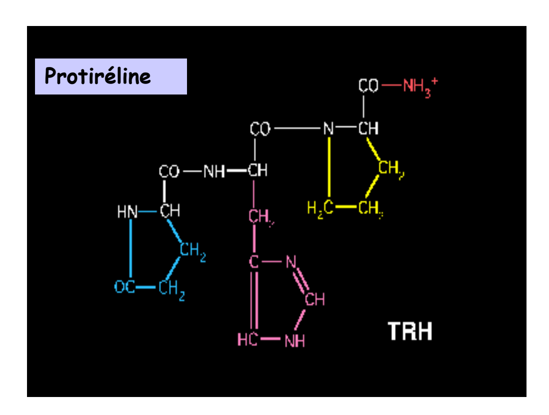
Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys

S——S

La somatostatine (chaîne de 14 AA)

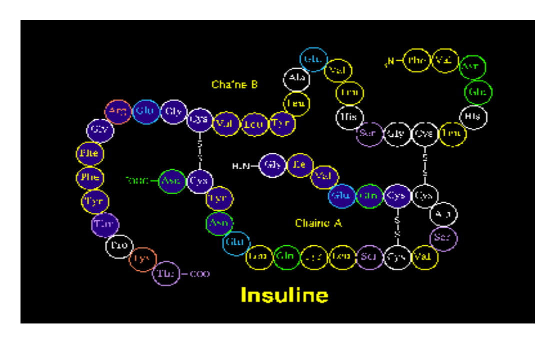
° La TRH ou protiréline :

(Thyrotropin Releasing Hormone) est l'hormone hypothalamique qui stimule l'antéhypophyse à libérer la TSH (Thyrotropine). La TRH est un tripeptide: L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-proline amide.



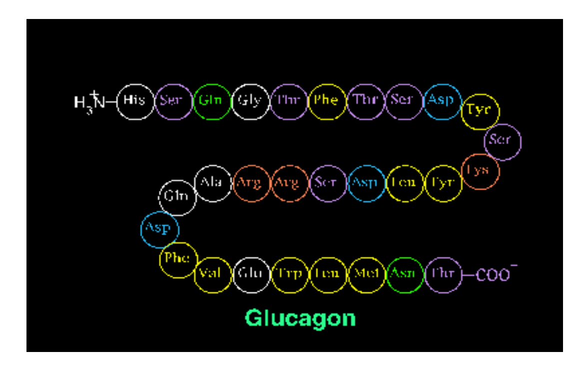
3-Hormones Pancréatiques:

° L'insuline: hormone hypoglycémiante secrétée par le pancréas endocrine, elle est formée de 2 chaînes peptidiques: A (21AA) et B (30AA) liées par deux ponts disulfure .



Son effet est hypoglycémiant dès que le taux de glucose dans le sang (glycémie) dépasse 6.10-3 M.
L'insuline favorise le retour de la glycémie à la valeur basale de 5.10-3 M.

° Le Glucagon: hormone hyperglycémiante secrétée par le pancréas endocrine , formée de 29 AA.C'est une chaîne unique sans pont disulfure.



Son effet est hyperglycémiant dès que le taux de glucose dans le sang (glycémie) est inférieur à 4.10-3 M.
Le Glucagon favorise le retour de la glycémie à la valeur basale de 5.10-3 M.

4-Hormones digestives:

° La gastrine: stimule la sécrétion gastique.
° La sécrétine: formée de 27 AA stimule la sécrétion du suc pancréatique.
° La pancréozymine: (CCK), formée de 33 AA provoque la sécrétion des enzymes pancréatiques.

B- Peptides Neurotransmetteurs:

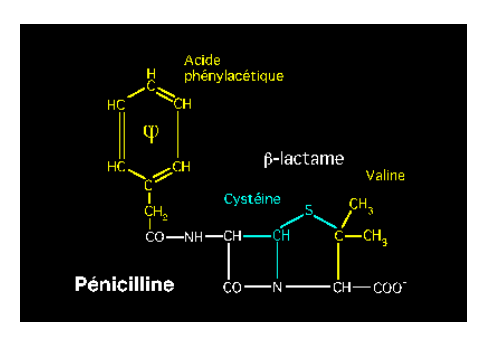
Ils sont libérés au niveau de la terminaison des axones et des membranes pré-synaptiques en diffusant vers la membrane post-synaptique.

° Enképhaline : pentapeptide à activité analgésique (Morphine)

C- Peptides de microorganismes:

Ils sont isolés de milieu de culture de microorganismes, doués d'une activité antibiotique utilisée en thérapeutique.

°La pénicilline est un tripeptide produit par un champignon *Penicillium chrysogenum*, qui a été le premier antibiotique naturel découvert par Fleming.



Les Protéines

Les **acides aminés libres** circulant pénètrent d'abord à l'intérieur des cellules à l'aide de transporteurs aminés.

Ces **transporteurs** sont sodium-dépendants et consomment de l'énergie.

Avant d'être utilisé pour la synthèse protéique, un acide aminé doit être activé ("**chargé**") par un ARNt sous l'influence d'une aminoacyl-ARNt synthétase.

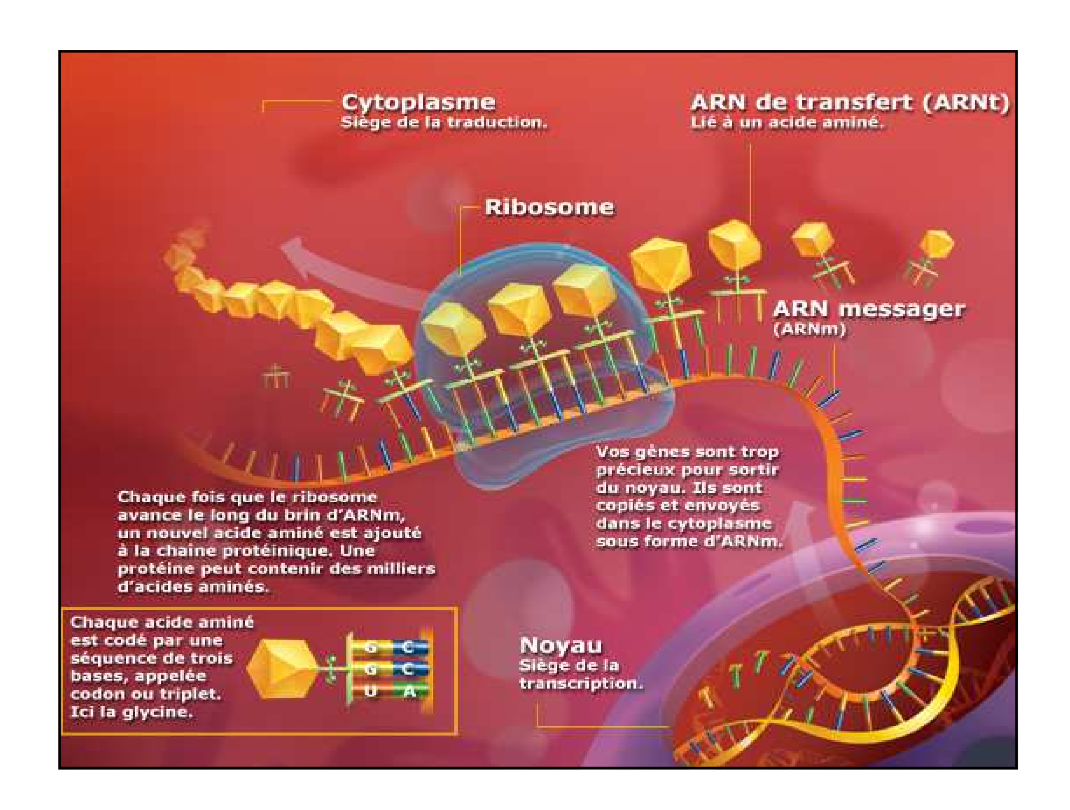
Il existe vingt **aminoacyl-ARNt** synthétases, chacune étant spécifique d'un acide aminé.

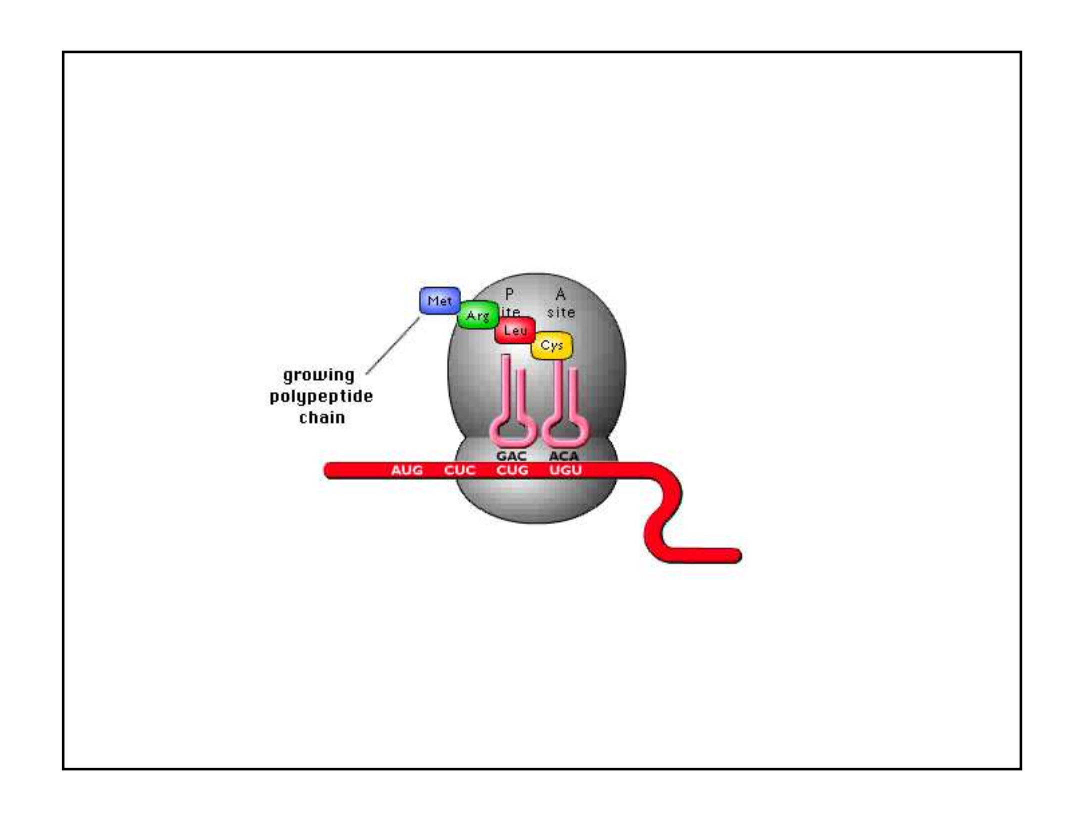
Biosynthèse protéique

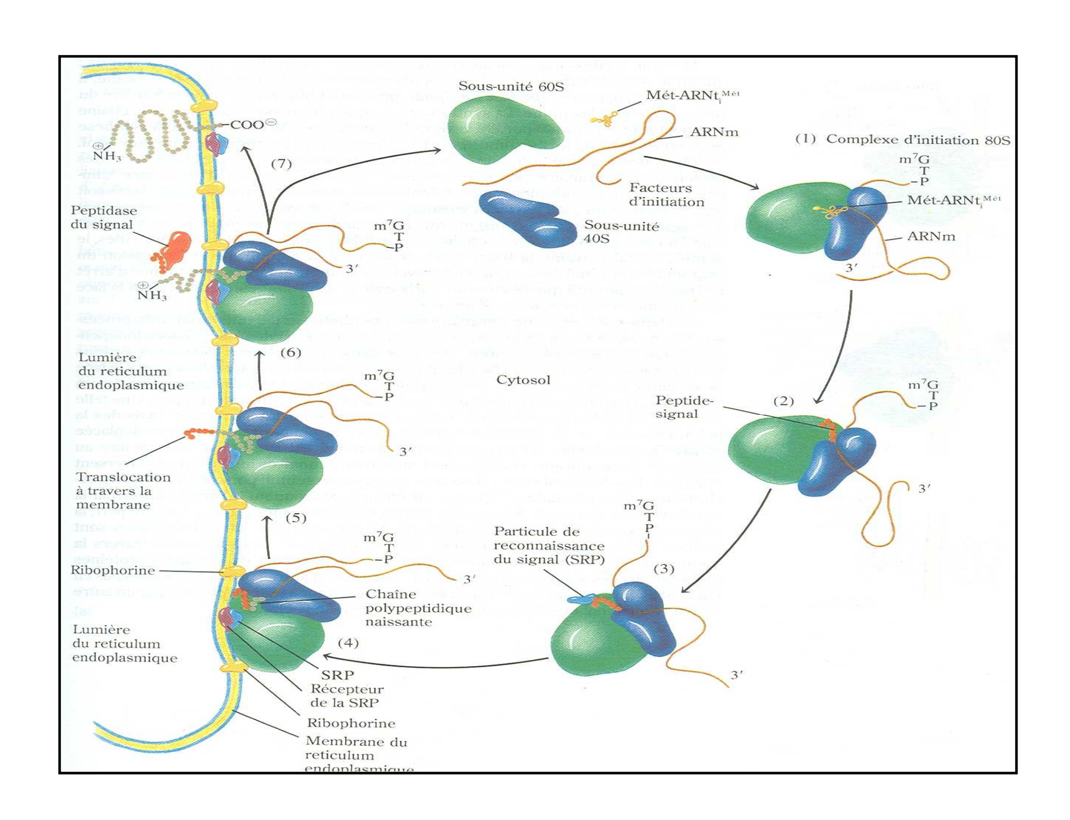
La synthèse des protéines comprend deux étapes:

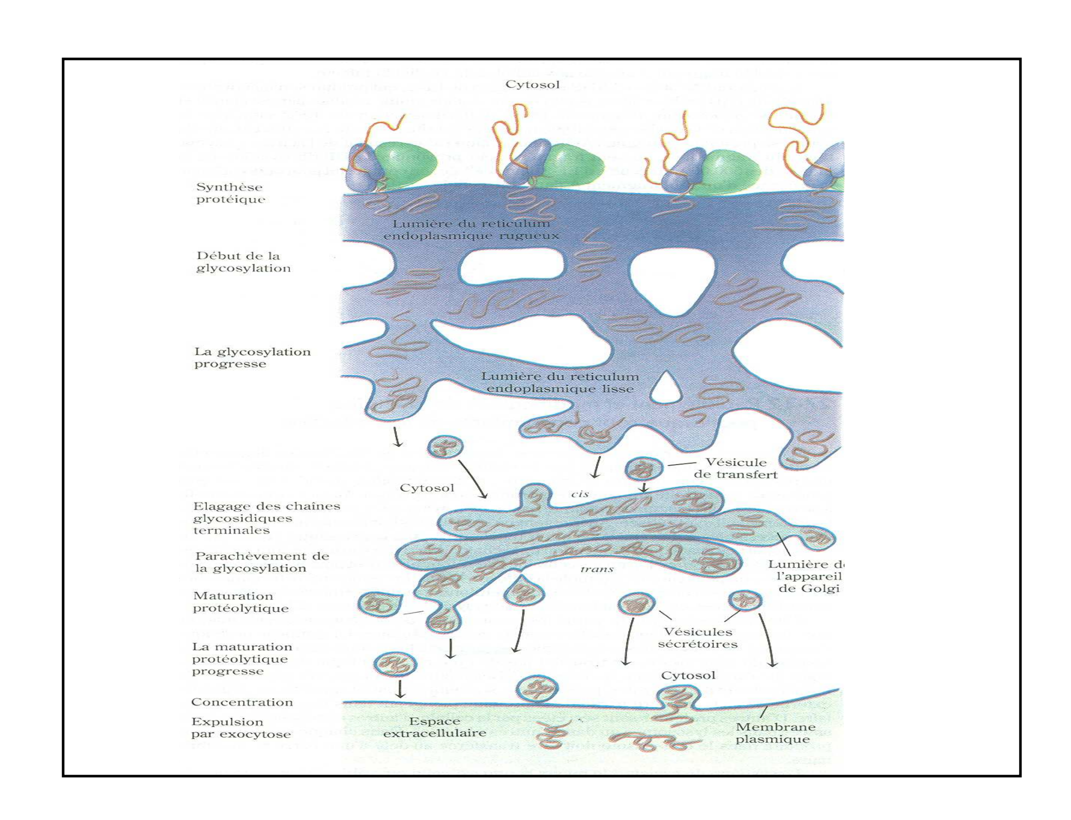
-la transcription permet de copier l'ADN en ARNm. Elle est réalisée grâce à l'ARN polymérase.

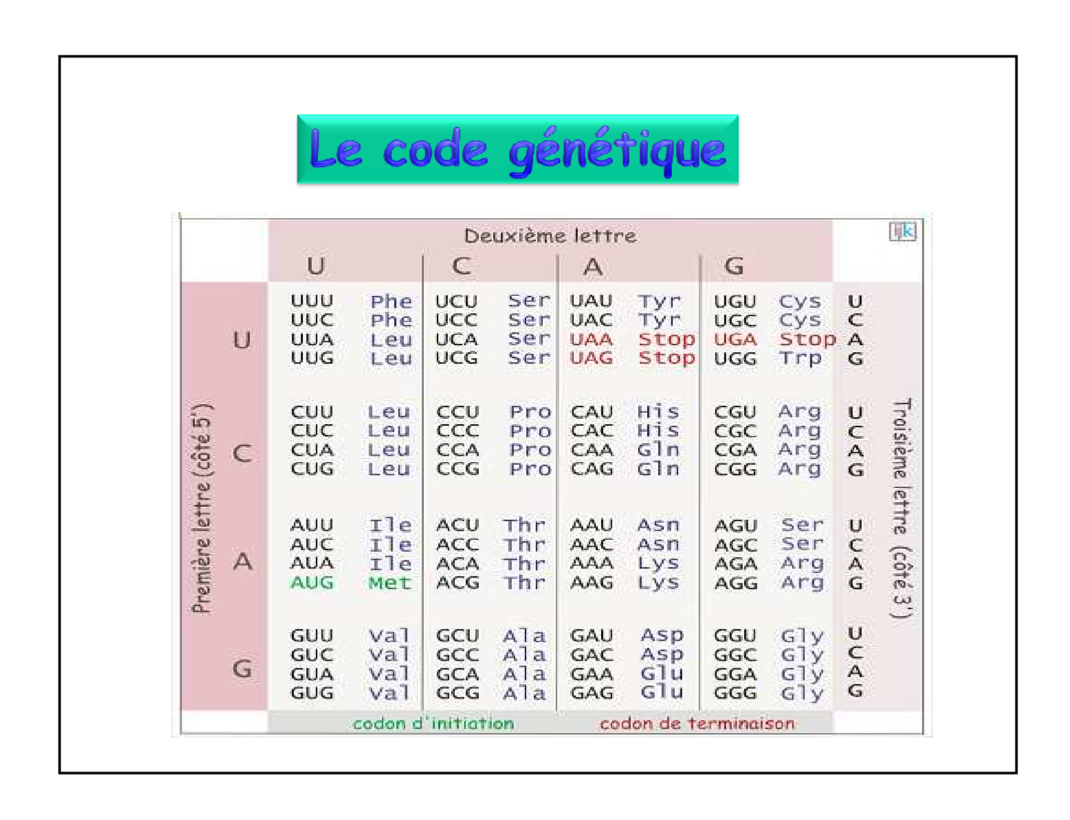
- la traduction correspond au décodage de l'information portée par l'ARN m en protéines, grâce au code génétique




Met
Arg
Leu
Cys
P site
A site
growing polypeptide chain
GAC ACA
AUG CUC CUG UGU


Sous-unité 60S
Mét-ARNt
ARNm
(1) Complexe d'initiation 80S
Facteurs d'initiation
Sous-unité 40S
Peptidase du signal
Lumière du reticulum endoplasmique
Cytosol
Peptide-signal
(2)
Translocation à travers la membrane
Particule de reconnaissance du signal (SRP)
(3)
Ribophorine
Chaîne polypeptidique naissante
(4)
(5)
(6)
(7)
SRP
Récepteur de la SRP
Ribophorine
Membrane du reticulum endoplasmique





Le code génétique

Première lettre (côté 5')	U		C		A		G		Troisième lettre (côté 3')
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	A
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

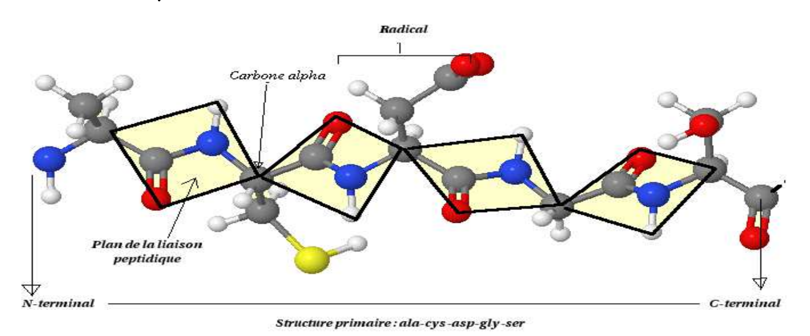
Deuxième lettre

codon d'initiation — codon de terminaison

Quels sont les différents niveaux d'organisation dune structure protéique ?

Structure primaire ou séquence de la protéine

La structure primaire d'une protéine correspond à l'ordre d'enchaînement des acides aminés, la séquence commence par l'AA Nt et se termine par l'AA Ct, cette succession correspond au sens de la traduction de la protéine.



Les AA sont reliés entre eux par des liaisons peptidiques covalentes, formant des plans successifs et dont la disposition les uns par rapport aux autres donnera la structure de la protéine dans l'espace.

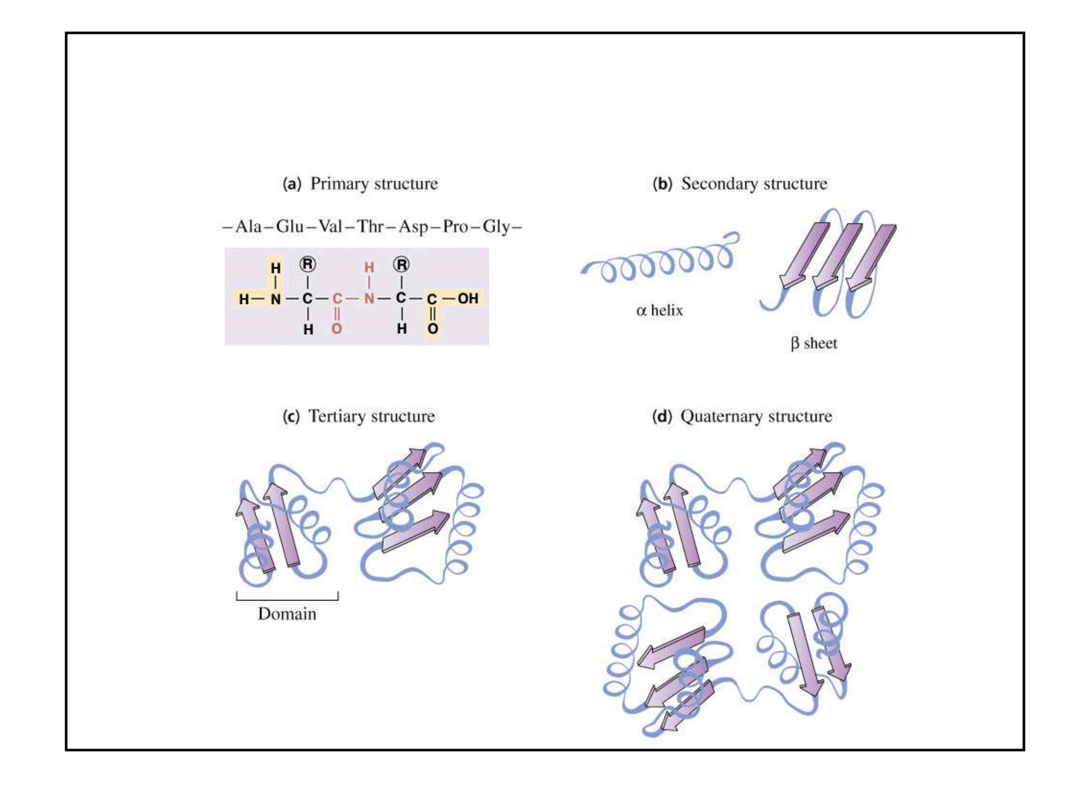
Structure tridimentionelle des protéines

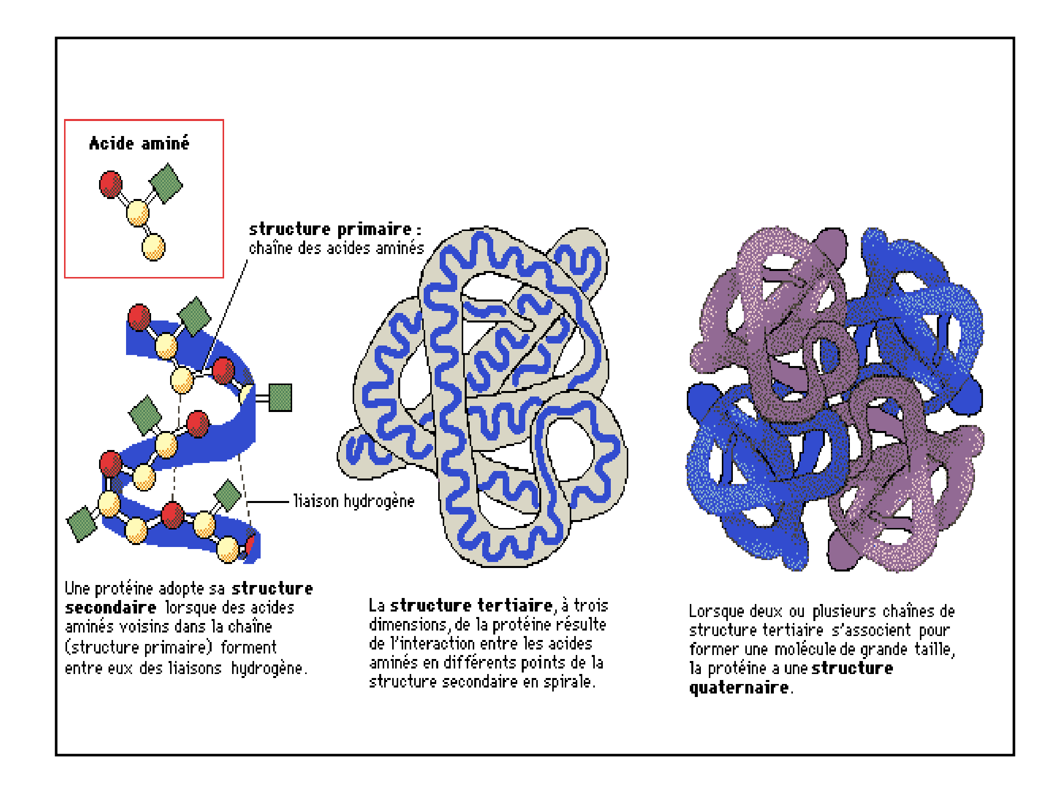
A-Structure conformationelle :

La structure secondaire : forme de la chaîne peptidique possédant des liaisons **non covalentes.**

La structure tertiaire : forme de l'ensemble de la chaîne peptidique avec ses repliements éventuels.

La Structure quaternaire : géométrie de l'association des différentes chaînes ente elles .





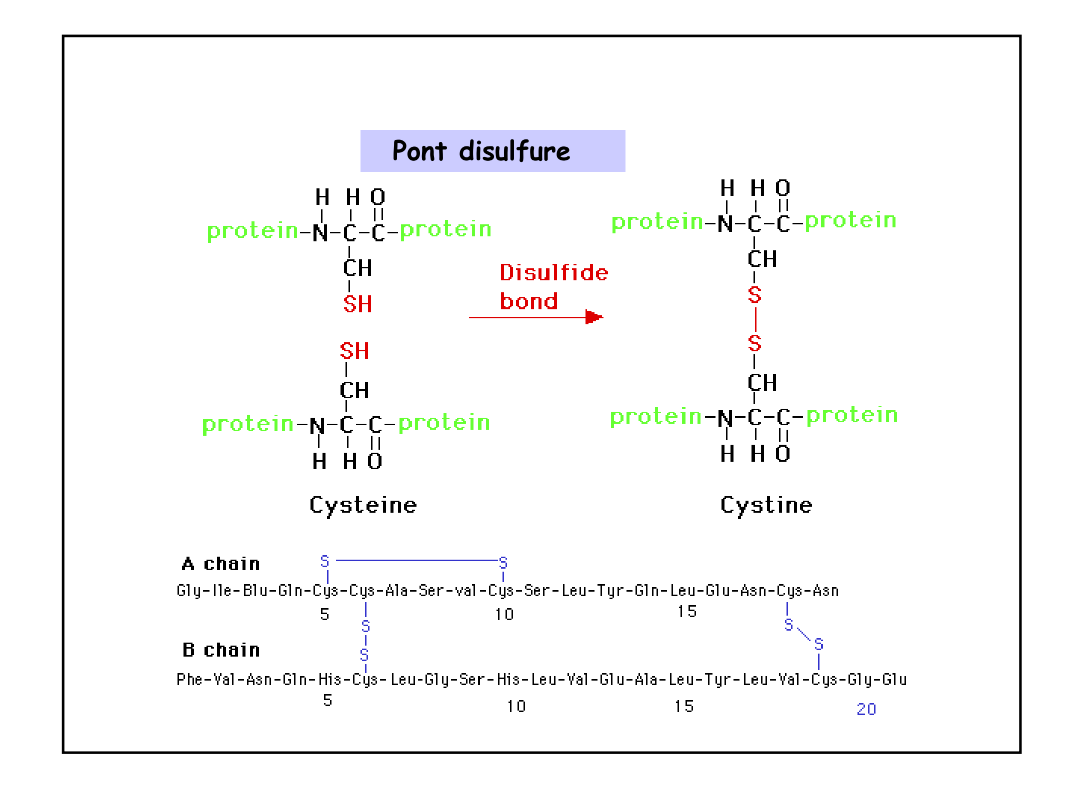
Les interactions protéiques

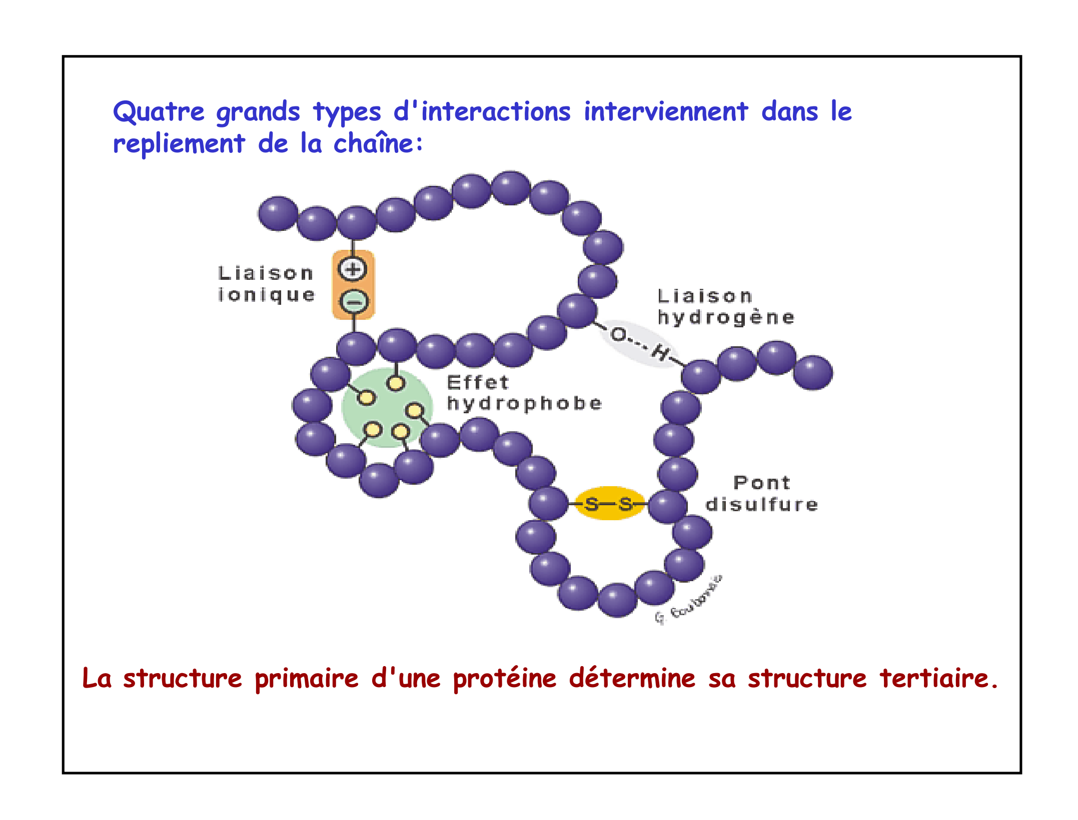
-**Liaisons hydrophobes**: Les AA hydrophobes ont plus d'affinité entre eux, (interactions de Van der Waals).

-Liaisons ioniques: Les radicaux qui s'ionisent positivement forment des liaisons ioniques avec ceux qui s'ionisent négativement.

-Liaisons hydrogènes: des liaisons « *intra-moléculaires* » entre C=O et N-H peptidiques.

-Les ponts disulfure: liaison covalente entre 2 Cys par l'atome de soufre.


Pont disulfure
protein-N-C-C-protein
CH
SH
Disulfide
bond
Cysteine
Cystine
S
A chain
Gly-Ile-Blu-Gln-Cys-Cys-Ala-Ser-val-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Cys-Asn
B chain
Phe-Val-Asn-Gln-His-Cys- Leu-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu
5
10
15
20


Quatre grands types d'interactions interviennent dans le repliement de la chaîne:
Liaison ionique
Liaison hydrogène
O---H
Effet hydrophobe
S—S
Pont disulfure
La structure primaire d'une protéine détermine sa structure tertiaire.

B- Structures ordonnées

Deux types principaux de structure ordonnée :

L'hélice alpha

La chaîne AA prend la forme d'un tire-bouchon. Les différentes spires sont stabilisées par des liaisons hydrogènes.

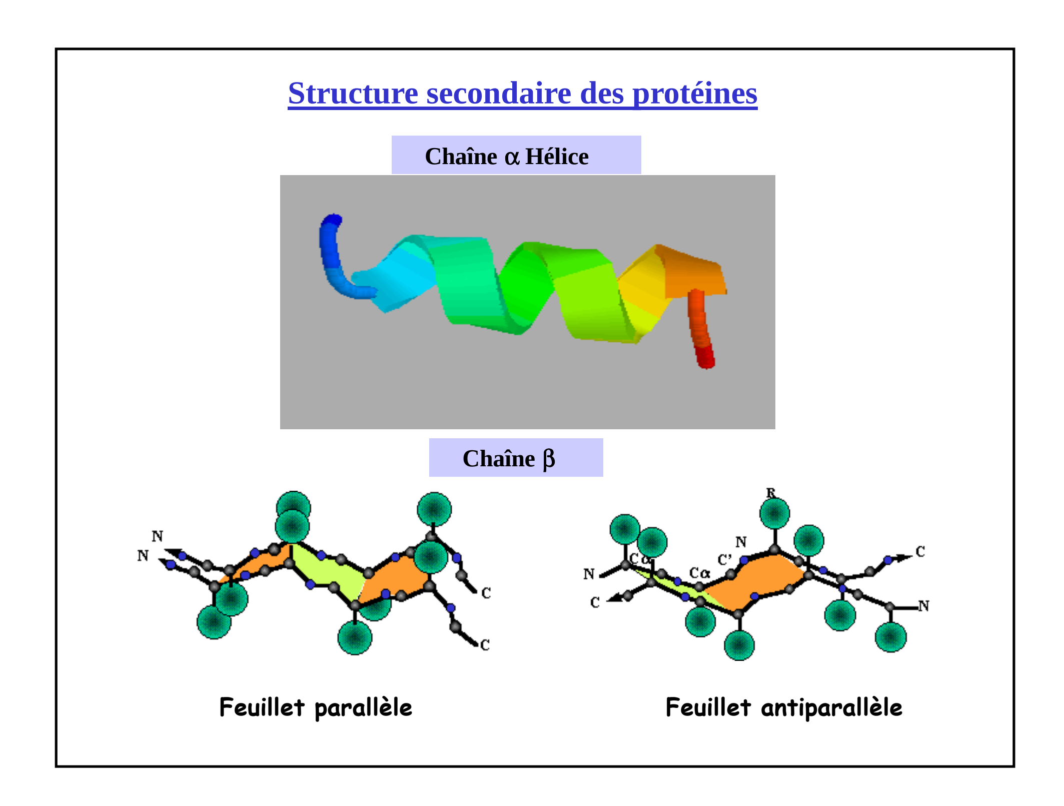
Le feuillet bêta

Il se forme des liaisons hydrogène entre certains AA de la chaîne disposés parallèlement les uns par rapport aux autres, ou d'une façon antiparallèle. (membrane plissée).

Le coude bêta

Chaînes peptidiques repliée sur elles mêmes de façon antiparallèle, une telle conformation est stabilisée par des liaisons hydrogènes.

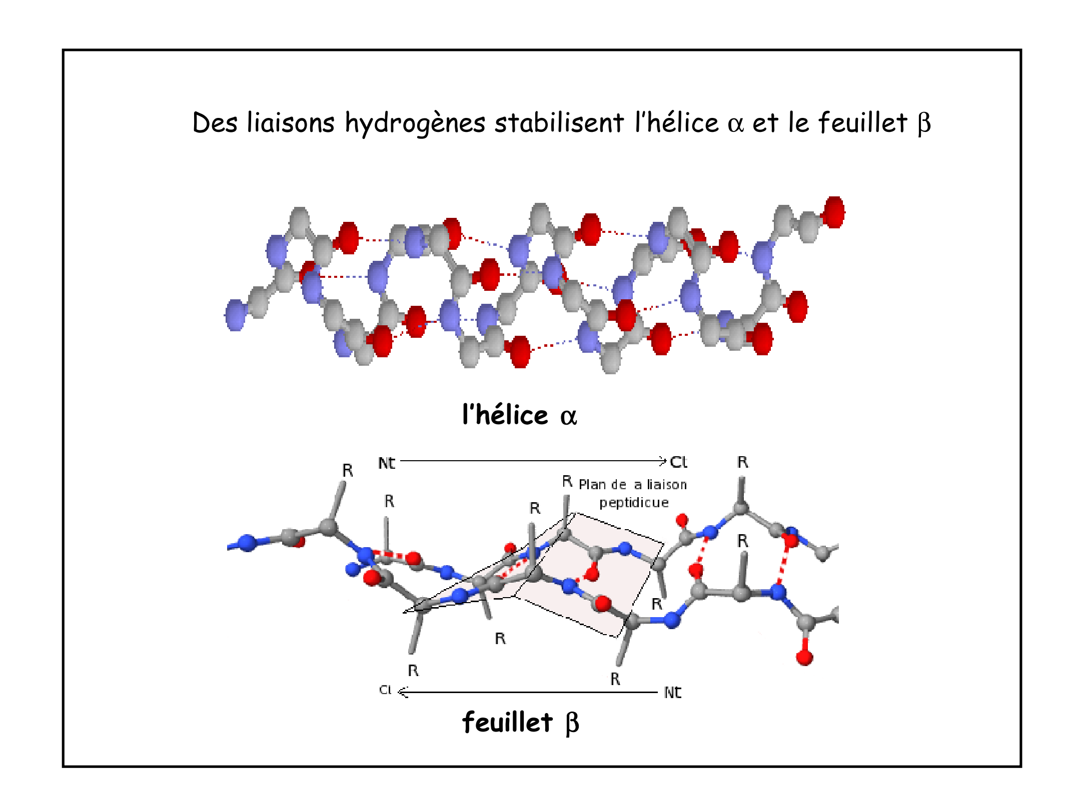
Structure secondaire des protéines



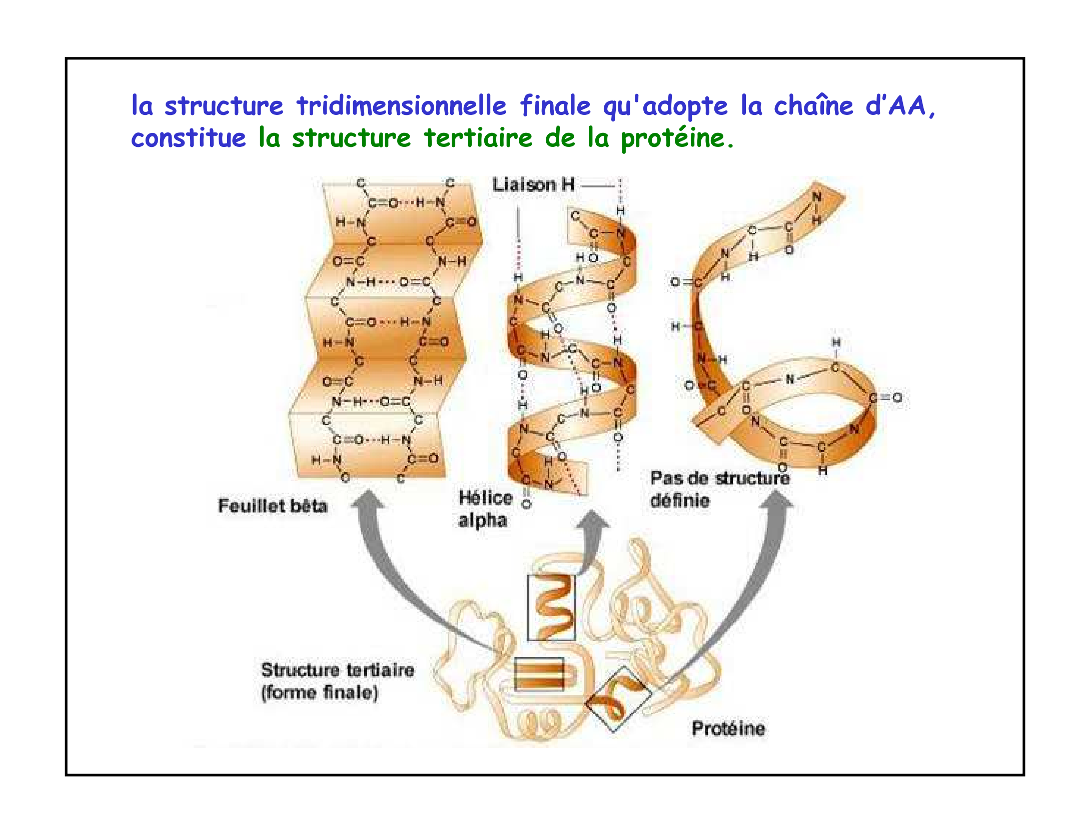
Feuillet parallèle

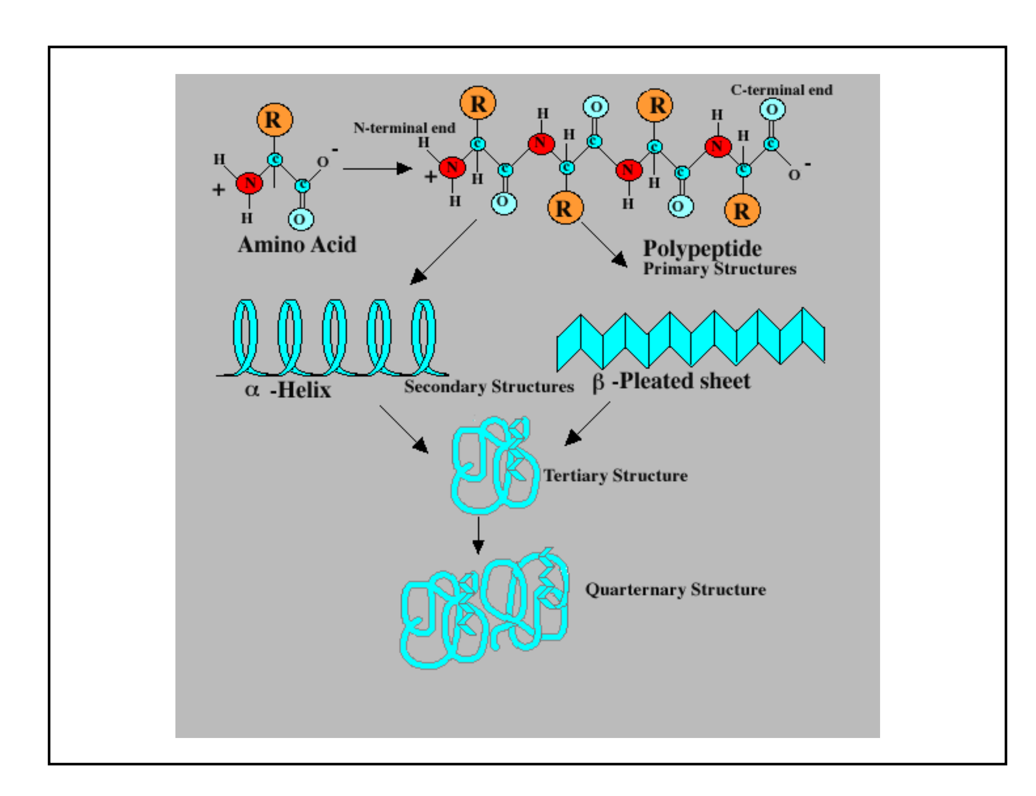
Feuillet antiparallèle

Des liaisons hydrogènes stabilisent l'hélice α et le feuillet β



la structure tridimensionnelle finale qu'adopte la chaîne d'AA, constitue la structure tertiaire de la protéine.





C- Hiérarchie dans la conformation des protéines

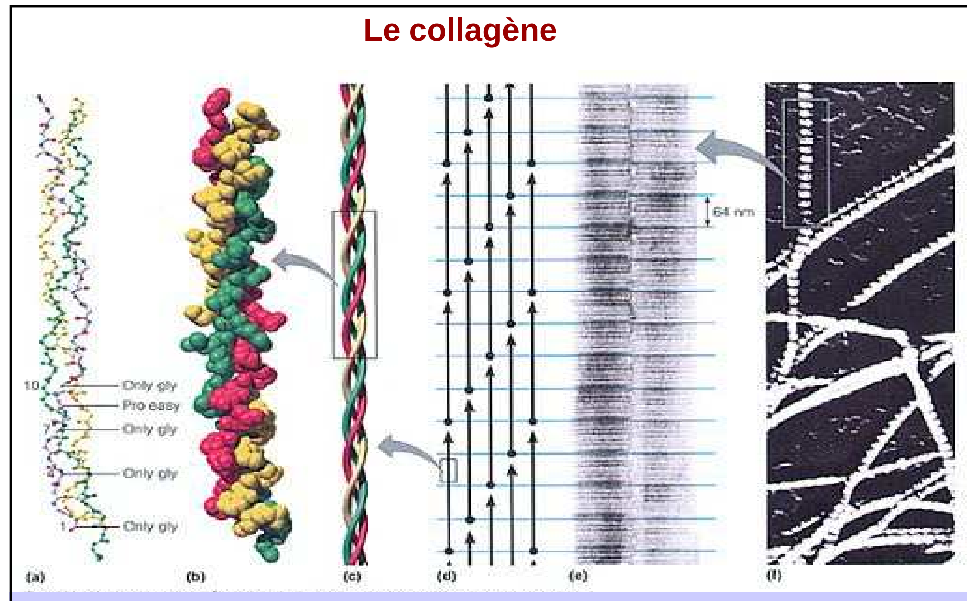
Les protéines fibreuses:

Le collagène: Le *derme* de la peau est formé d'un dense treillis de fibres de collagène

La kératine : Les ongles, la couche cornée de la peau, la corne des animaux, les cheveux, les poils et les plumes sont toutes des structures essentiellement constituées de kératine.

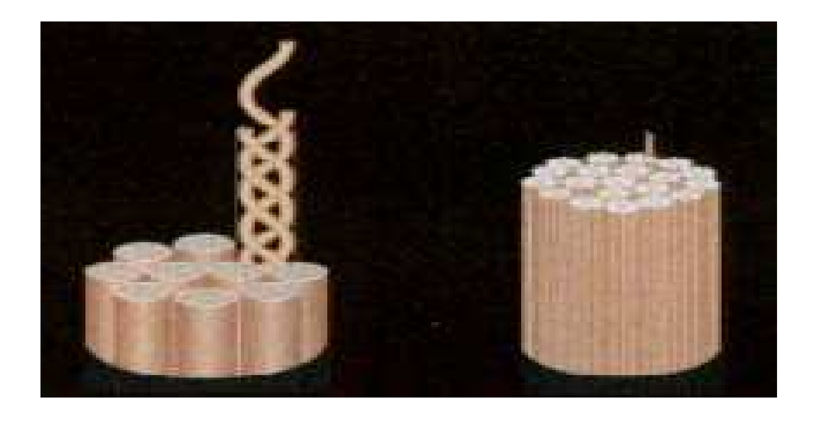
Le cytosquelette: il forme l'armature de la cellule, il est constitué de trois types de fibres de protéines: les microtubules, les microfilaments et les filaments intermédiaires.

Le collagène



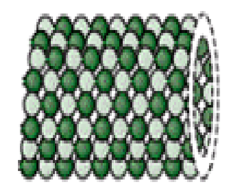
Chaque molécule de collagène est formée d'une hélice alpha. Des ponts disulfure relient ces hélices trois à trois (a, b et c). Les groupes de trois sont reliés entre eux pour former de grosses fibres (d) très résistantes visibles au microscope électronique (e et f).

La kératine

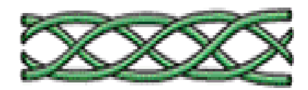


La kératine est semblable au collagène. Elle est formée de fibrilles constituées de trois hélices alpha reliées entre elles par des ponts disulfure

Le cytosquelette







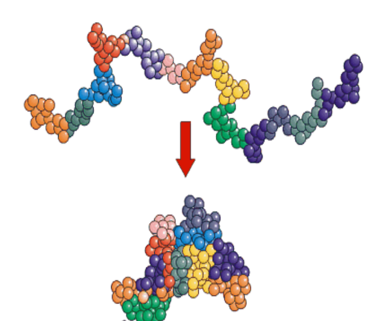
Le cytosquelette est responsable de la forme particulière de chaque cellule, de sa résistance aux tensions et des mouvements qu'on y observe parfois.

Le cytosquelette est constitué de trois types de fibres de protéines: les microtubules, les microfilaments et les filaments intermédiaires

Les protéines globulaires:

Coexistance de structures ordonnées et non ordonnées qui donne un repliement de la chaîne polypeptidique sur elle-même.

Le lysozyme : formé de zones non ordonnées, 3 segments d'hélice α et 2 segments de feuillet β.



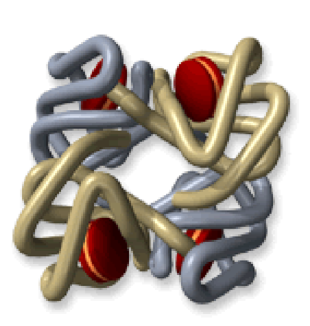
La chaîne d'AA formant le lysozyme se replie pour former une structure plus compacte bien précise

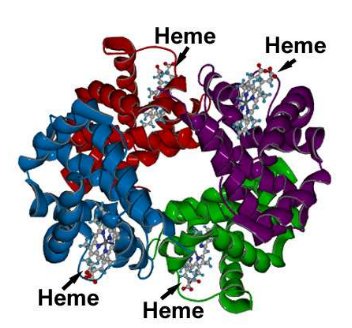
La myoglobine : formée de 8 segments d'hélice α séparés par des structures non ordonnées.

Structure quaternaire des protéines globulaires

Des protéines globulaires: formées de SU ou protomères ou domaines, associées entre eux par des liaisons secondaires.

l'hémoglobine: transport de l'oxygène dans le sang





L'hémoglobine est formée de 2 chaînes α et de 2 chaînes β. Les hèmes contenant chacun un atome de fer sont représentés par les disques rouges.

Propriétés physiques et chimiques des protéines

Les protéines sont des substances de masse moléculaire élevée; on distingue :-les holoprotéines : AA uniquement.

-les hétéroprotéines : en plus des AA , un groupement de nature non protidique.

A- Caractère de solubilité

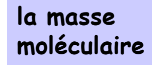
La plus part des protéines sont solubles en milieu aqueux, la solubilité dépend du:

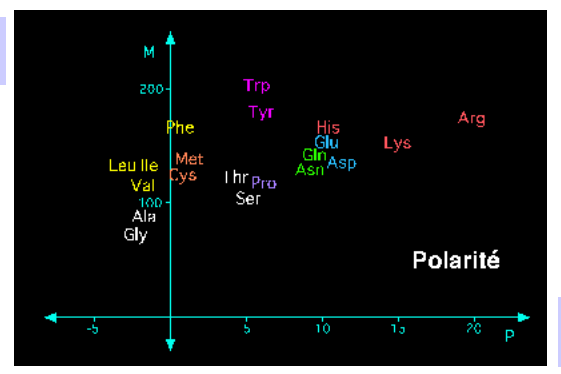
- pH : la protéine est moins soluble au voisinage de son pHi.
- force ionique : Le sulfate d'ammonium augmente la force ionique
- solvants organiques : les solvants organiques miscibles à l'eau ont un effet précipitant sur les protéines,en diminuant leur solubilité , ex éthanol)

Les protéines solubles sont les protéines globulaires.

Les protéines insolubles dans l'eau, sont les scléroprotéines.

B- Propriétés ioniques d'une protéine





un indice de polarité

Le caractère amphotère des radicaux des AA ionisables qui constituent les protéines est très important pour la structure et les fonctions de ces radicaux dans les domaines de la protéine. On peut déterminer la charge globale d'une protéine à n'importe quel pHt en calculant la charge de chaque AA ionisable qui la compose .

C- Dosage colorimétrique

La réaction au Biuret est obtenue par toutes les protéines et peut servir à leur dosage colorimétrique, la méthode de Lowry est beaucoup plus sensible: elle combine la réaction du biuret à la réduction par les phénols (réactif de Folin).

La plus part des protéines absorbent la lumière UV à DO 280nm, Cette absorption est en relation avec la Tyrosine et le Tryptophane de la protéine. La mesure de la DO à 280 nm peut servir au dosage des protéines

E- Dénaturation des protéines

Les liens protéiques peuvent se défaire, aboutissant à une structure désordonnée : C'est la dénaturation, elle est due :

La chaleur: l'agitation thermique peut briser les liaisons hydrogène.

Un pH extrême: milieu trop acide ou trop alcalin.

Un milieu très concentré en électrolytes: ions.

Les solvants organiques.

Certaines substances chimiques peuvent aussi réagir avec la protéine et briser les liaisons ioniques ou même les ponts disulfures.

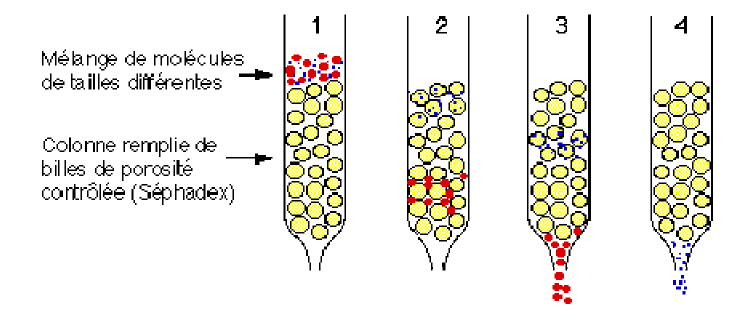
Fractionnement des protéines

A- Purification des protéines

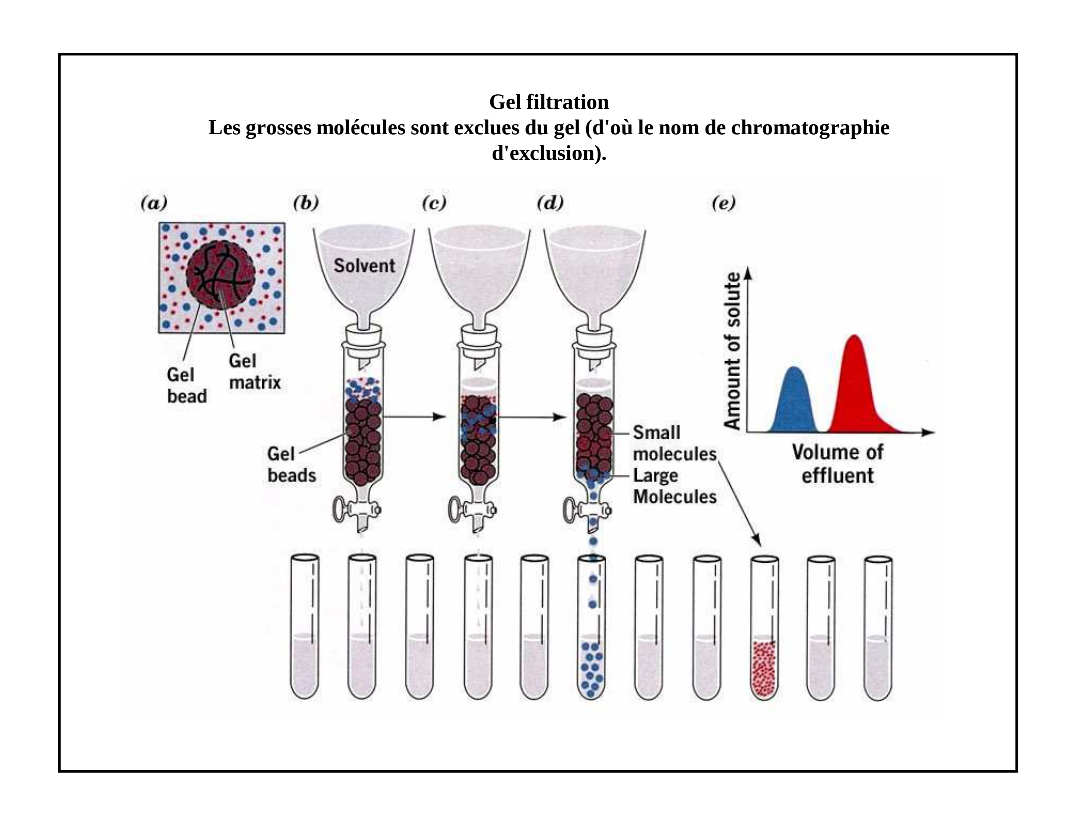
Par ultracentrifugation (65.000t/mn) , cette séparation sera fonction du PM.

B- Extraction des protéines

1- Par gel filtration ou tamisage moléculaire sur colonne de chromatographie formée par un gel de séphadex .



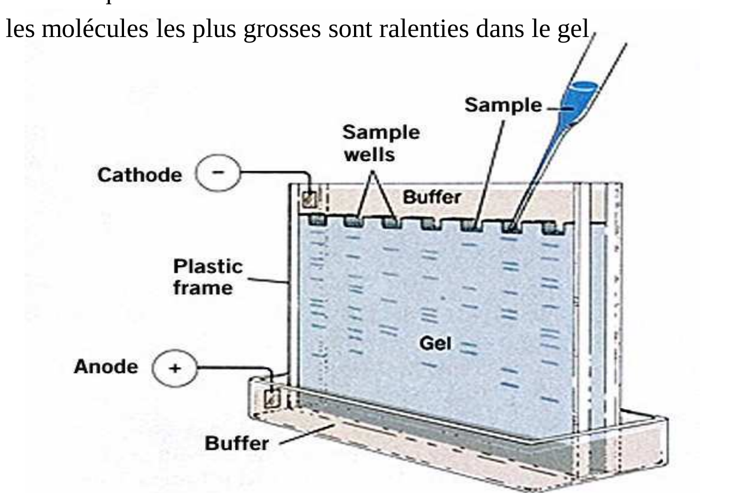
Gel filtration
Les grosses molécules sont exclues du gel (d'où le nom de chromatographie d'exclusion).



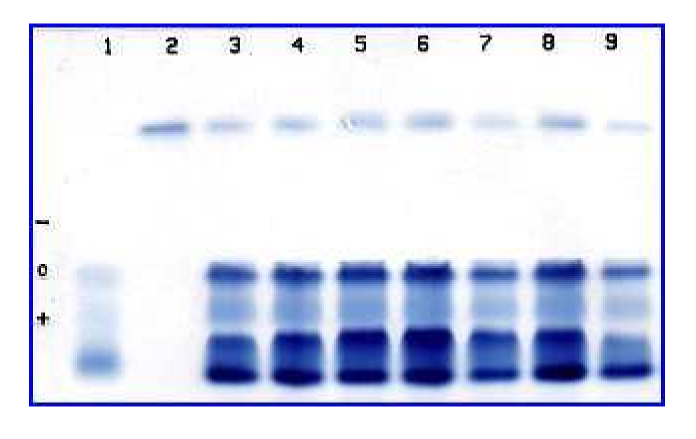
2- Eléctrophorèse sur gel de polyacrylamide

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide + sodium dodecylsulphate (SDS)

- les protéines liées au SDS ont toutes la même charge, séparation selon la taille uniquement
- les molécules les plus grosses sont ralenties dans le gel

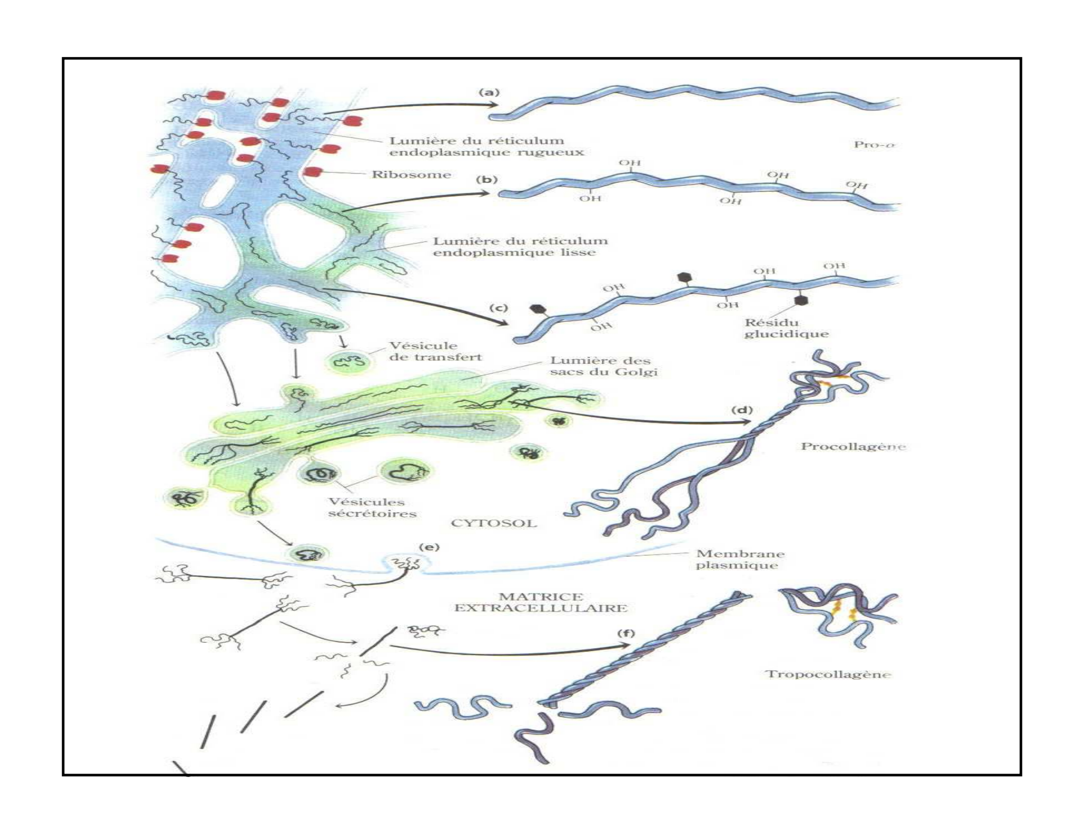


La vitesse de migration sera fonction de la masse moléculaire.
(les petites molécules migrent plus vite par rapport aux grosses molécules)
En présence de Sodium dodécylsulfate (SDS), détergent anionique qui dissocie les polymères de protéines, en tapissant chaque SU de(SO3-)



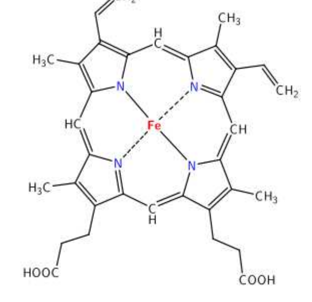
Relation structure fonction

Synthèse et sécrétion d'une protéine fibreuse: Le collagène



Les transporteurs protéiques

L'hémoglobine : est une protéine métallique contenant du fer dont la principale fonction est le transport de l'oxygène à l'intérieur des globules rouges dans le sang.



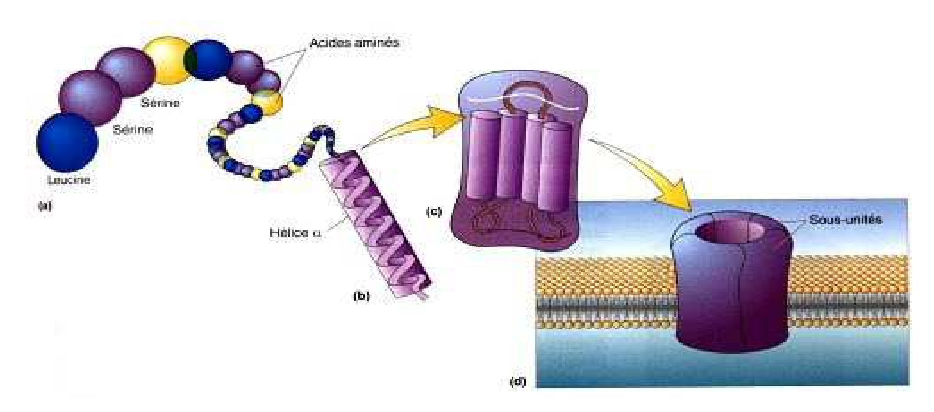
Structure de l'hémoglobine

Un hème: porphyrine-fer

L'hémoglobine est un **tétramère**: 2SU α et 2 SU β, pour une masse totale ~64 000 .
Au cœur de chaque globine se trouve un cycle hétérogène :porphyrine qui contient un atome de fer qui fixe l'oxygène.
La capacité totale de liaison de l'hémoglobine pour l'oxygène est de quatre molécules.

Transport membranaire

De nombreuses substances chimiques traversent la membrane en passant par de petits canaux faits de protéines.

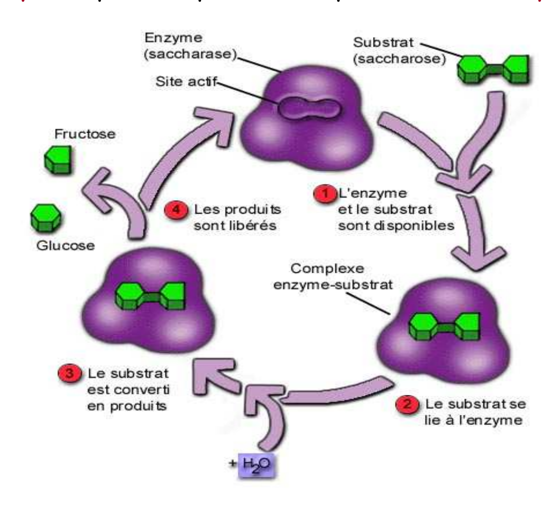


Canal protéique traversant la membrane de la cellule. le canal est formé de 5 SU chacune formée d'un assemblage d'hélices alpha.

Les enzymes

Les enzymes

La plus part des réactions chimiques qui se déroulent dans la cellule sont catalysées par des protéines spéciales: les enzymes .



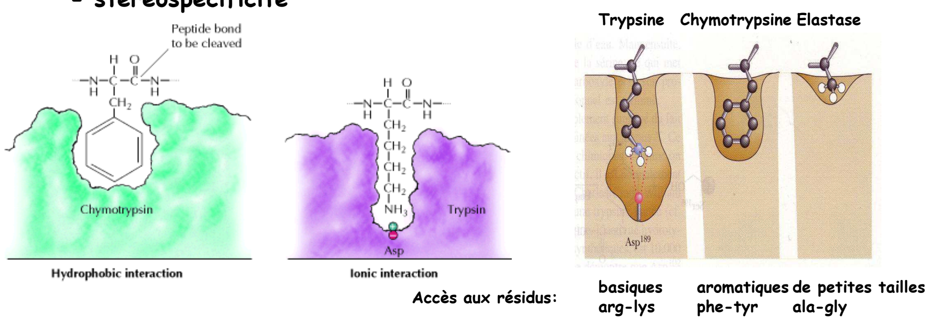
Mode d'action des enzymes

Au niveau d'une certaine région protéique, les AA adoptent des caractéristiques chimiques spécifiques. Cette région est appelée site actif, où s'effectue la réaction chimique catalysée par une enzyme.

le site actif : cavité complémentaire à la structure du substrat

- **complémentarité géométrique**
- **complémentarité électronique: interaction hydrophobe, liaison hydrogène, liaison ionique**
- **stéréospécificité**



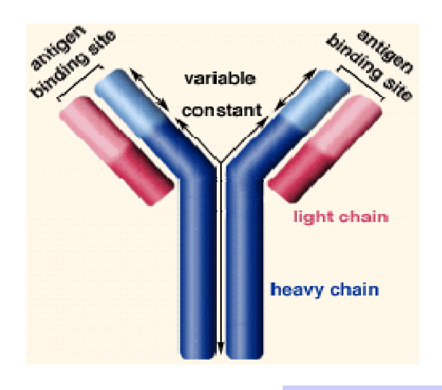


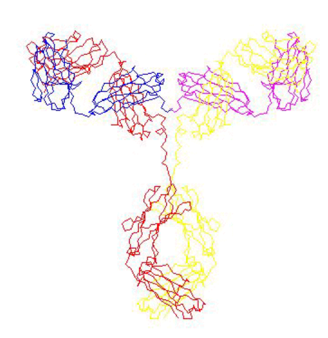
les défenses de l'organisme

Ce sont les Anticorps

Les anticorps fabriqués par certains globules blancs ,sont de grosses protéines : les Immunoglobulines, composées de plusieurs types de sous-unités (chaînes), de masses différentes (chaînes lourdes, chaînes légères)

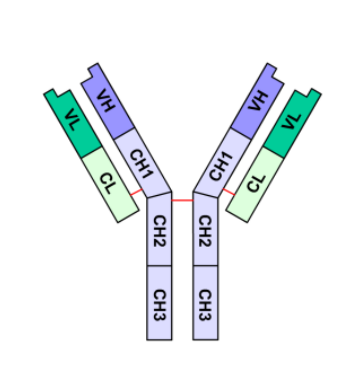
Structure des Immunoglobulines

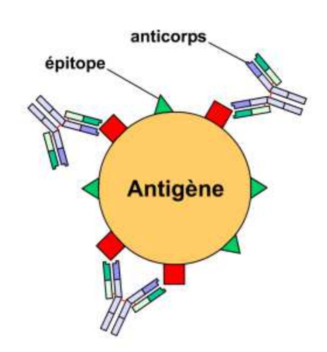




2 chaînes longues (lourdes) et
2 chaînes courtes (légères).

On distingue deux domaines : un du côté NH2-terminal, dit domaine variable et un en COOH-terminal dit domaine constant. Dans chacun de ces domaines se trouvent deux feuillets ß unis par un pont disulfure.





Domaines constants

Les domaines constants ne sont pas impliqués dans la reconnaissance de l'antigène, mais dans la fonction de défense.

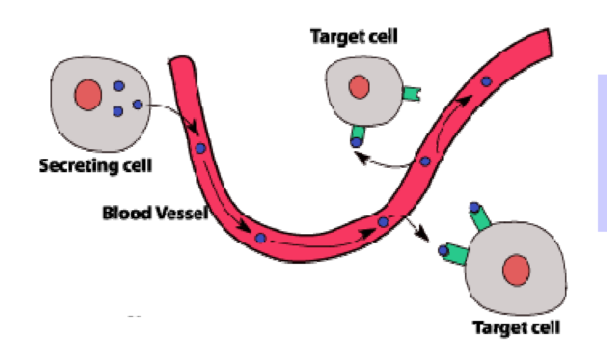
Domaines variables

Une immunoglobuline possède quatre domaines variables situés aux extrémités des deux « bras » et constitue le site de reconnaissance de l'antigène.

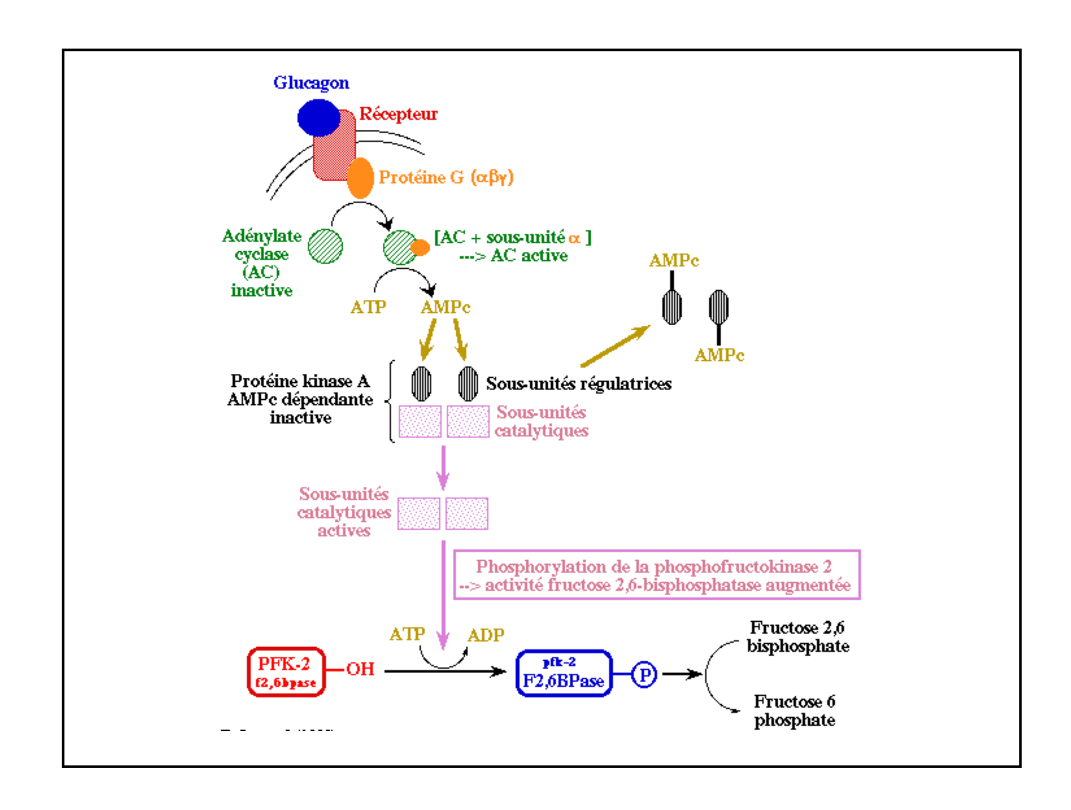
Les Hormones

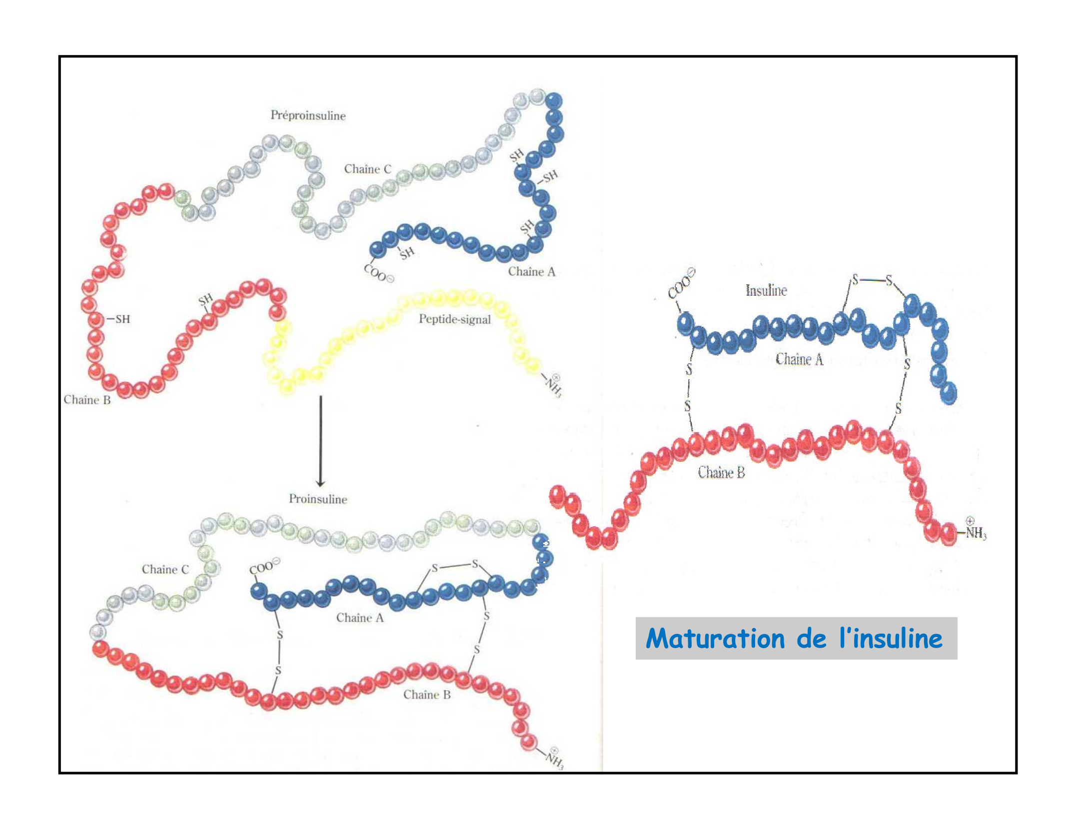
Les Hormones

Les hormones protéiques ne peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules, elles se fixent sur la membrane au niveau de sites récepteurs spécifiques.



Les cellules réceptrices déclenchent une série de réactions chimiques pour provoquer une réponse donnée.


Glucagon
Récepteur
Protéine G (αβγ)
Adénylate cyclase (AC) inactive
[AC + sous-unité α]
---> AC active
ATP
AMPc
AMPc
AMPc
Protéine kinase A AMPc dépendante inactive
Sous-unités régulatrices
Sous-unités catalytiques
Sous-unités catalytiques actives
Phosphorylation de la phosphofructokinase 2
--> activité fructose 2,6-bisphosphatase augmentée
ATP
ADP
PFK-2
f2,6bpase
—OH
pfk-2
F2,6BPase
P
Fructose 2,6 bisphosphate
Fructose 6 phosphate


Préproinsuline
Chaine C
Chaine A
Chaine B
Peptide-signal
Proinsuline
Chaine C
Chaine A
Chaine B
Insuline
Chaine A
Chaine B
Maturation de l'insuline

Hormone hypoglycémiante secrétée par le pancréas endocrine, elle est formée de 2 chaînes peptidiques: A (21AA) et B (30AA) liées par deux ponts disulfure .

L'insuline passe dans le sang à travers l'endothélium du capillaire et excerse son action au niveau de ses cellules-cibles (hépatocytes, adipocytes et cellules musculaires)

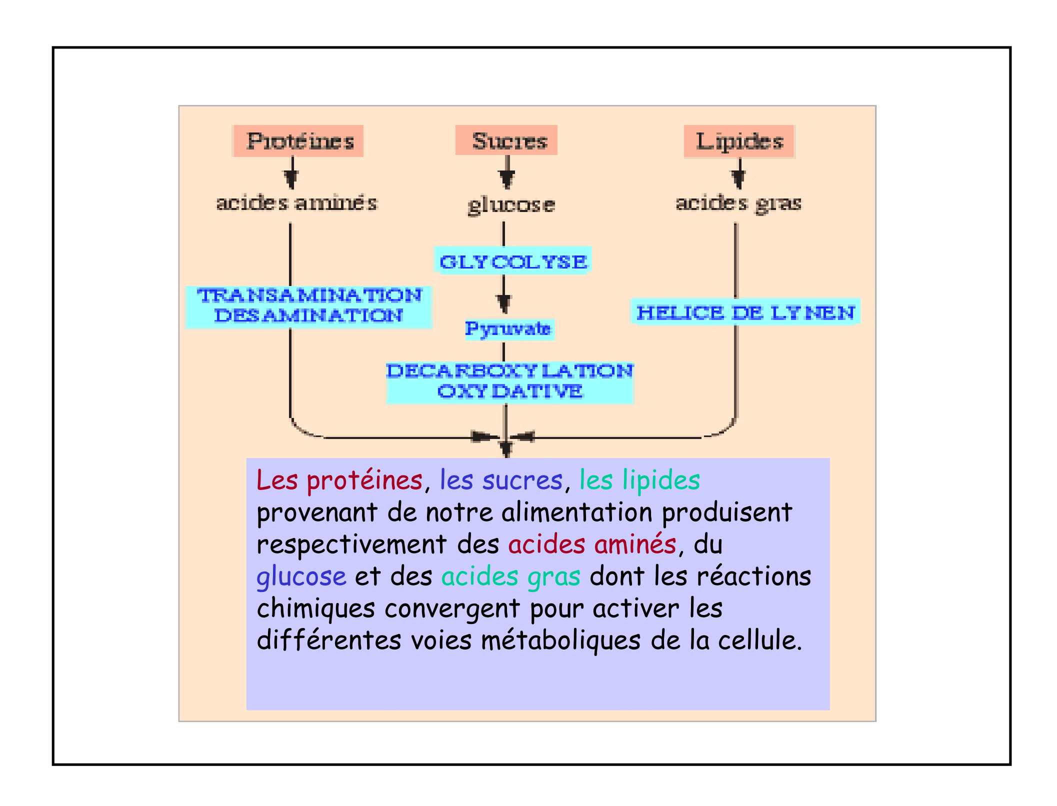
L'action de l'insuline passe par l'activation de certaines enzymes qui catalysent la synthèse du glycogène .

CONCLUSION

Les protéines sont les composés organiques les plus complexes et les plus diverses des êtres vivants.

La variabilité de leur structure et la flexibilité de leur conformation permet aux protéines d'assurer les foncions les plus élaborées et les plus complexes dans l'organisme.

La maturation et l'adressage des protéines est le moyen qu'utilise la cellule pour acheminer chaque protéine vers sa destination finale.


Protéines
Sucres
Lipides
acides aminés
glucose
acides gras
GLYCOLYSE
TRANSAMINATION
DESAMINATION
Pyruvate
HELICE DE LYNEN
DECARBOXYLATION
OXYDATIVE
Les protéines, les sucres, les lipides provenant de notre alimentation produisent respectivement des acides aminés, du glucose et des acides gras dont les réactions chimiques convergent pour activer les différentes voies métaboliques de la cellule.